

# EFECTOS DE UN HIDROCARBURO AROMÁTICO POLICÍCLICO ( $\beta$ -NAFTOFLAVONA) SOBRE BIOMARCADORES DE EFECTO EN *Corydoras* *paleatus* EN CONDICIONES DE CAMPO Y LABORATORIO

P. I. SCARCIA, Y F. R. DE LA TORRE

Programa de Ecofisiología Aplicada. Dpto. Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján; CONICET  
fdelatorre@mail.unlu.edu.ar

**ABSTRACT.** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are important anthropogenic sources of aquatic contamination. In this study, hepatic biomarker responses of *Corydoras paleatus* injected with one sublethal dose of a PAH ( $\beta$ -naftoflavona, BNF) were assessed under laboratory and field conditions. Glutathion-S-transferase (GST) and catalase (CAT) hepatic activities, liver protein content (PC), condition factor (CF) and liver somatic index (LSI) were determined. Two bioassays were performed during winter time: laboratory (la) and field (ca). Fish were injected with 50 mg BNF/kg body weight dissolved in corn oil ( $\beta$ -la y  $\beta$ -ca); control fish received corn oil (C-la y C-ca). There were no differences between controls or in BNF injected fish in the assessed parameters. BNF provoked a tendency of increase in CAT and GST activities and lower values of CP; on the other hand, no differences were observed in the FC and IHS. In BNF field exposed fish ( $\beta$ -ca) CAT activity was significantly stimulated vs. both field and laboratory controls; GST differences were detected both between  $\beta$ -ca and  $\beta$ -la and their respective controls. BNF exposure induced adverse effects principally in the enzymatic biomarkers of *C. paleatus* and those effects were modulated by the environmental conditions.

**Keywords:** biomarkers - *Corydoras paleatus* - Polycyclic aromatic hydrocarbons - field and laboratory bioassays.

**Palabras Clave:** biomarcadores - *Corydoras paleatus* - hidrocarburos aromáticos policíclicos - ensayos de campo y laboratorio.

## INTRODUCCIÓN

La polución del ambiente acuático es un fenómeno de importancia producido por el aporte de innumerables compuestos tóxicos. Estos compuestos tóxicos pueden ser de origen orgánico, por ejemplo los bifenilos policlorados, pesticidas organoclorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), dioxinas, furanos o inorgánico, como los metales pesados. Algunos compuestos orgánicos considerados como importantes contaminantes ambientales pueden ser producidos tanto por procesos naturales como por actividades antrópicas.

Los HAPs son un ejemplo de lo anteriormente citado, si bien pueden ser aportados al ambiente acuático de forma natural por medio de incendios forestales o fuentes de petróleo naturales, la contaminación acuática es principalmente originada por fuentes de origen antropogénico

(combustión incompleta de combustible fósil, derrames de petróleo, descargas de barcos, efluentes industriales, etc.) A modo de ejemplo Colombo y col (2005) reportaron los efectos adversos producidos en el ambiente acuático ocasionados por un derrame de petróleo en las costas del Río de la Plata. Así detectaron una concentración creciente de HAPs en los siguientes compartimientos: agua (0-10  $\mu\text{g/L}$ ), sedimentos (0,01-1,3  $\mu\text{g/g}$ ) y biota (1,0-16  $\mu\text{g/g}$  en bivalvos; 0,5-6,9  $\mu\text{g/g}$  en macrófitas). De esta forma se observa que estos compuestos se encuentran principalmente asociados al sedimento, a la materia particulada o distribuidos en la biota y pueden ser transformados por oxidación química o fotoquímica, o bien de forma biológica por los organismos acuáticos (biotransformación). En particular, en los peces este último proceso ocurre principalmente en el hígado en donde los HAPs son

fácilmente metabolizados por enzimas de la fase I. Por su parte, la conjugación de metabolitos de la fase I o de compuestos electrofílicos está a cargo de enzimas de la fase II como la GST. La mayoría de éstas enzimas facilitan la excreción de estos compuestos mediante la adición de un grupo químico más polar (van der Oost *et al.*, 2003). A su vez, durante el metabolismo de los HAPs pueden generarse especies reactivas de oxígeno las cuales pueden producir efectos tóxicos para el organismo. Para neutralizar dicha toxicidad tanto mamíferos como peces poseen sistemas de defensa antioxidante, los cuales incluyen la participación de enzimas antioxidantes tales como la CAT y GST (Jifa *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2007).

La  $\beta$ -naftoflavona (BNF), análogo sintético de una serie de compuestos flavonoides encontrados naturalmente, es un HAP modelo que puede utilizarse para evaluar los procesos de biotransformación en organismos acuáticos. Los efectos biológicos adversos provocados por estas sustancias son susceptibles de ser evaluados mediante parámetros bioquímicos y fisiológicos marcadores de contaminación (biomarcadores).

La evaluación ecotoxicológica de la contaminación acuática puede ser abordada mediante el estudio de los biomarcadores empleando diferentes metodologías. Frecuentemente los peces son utilizados como organismos prueba. Los estudios de laboratorio son importantes ya que facilitan la interpretación de la información y permiten validar las respuestas de los biomarcadores como índices de monitoreo. Por su parte, los estudios en campo tales como el confinamiento de organismos prueba en jaulas, permiten evaluar las respuestas biológicas de los mismos brindando un enfoque más realista. Este tipo de ensayo ofrece también ventajas frente a la simple recolección de organismos de sitios contaminados ya que podría evitar una interpretación errónea de los resultados originada por ejemplo por un desplazamiento de los individuos fuera del sitio de muestreo debido a la presencia de contaminantes (Fenet *et al.*, 1998).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar las respuestas de parámetros biomarcadores de contaminación en *C. paleatus* frente a una dosis subletal de  $\beta$ -naftoflavona bajo condiciones experimentales de

campo y laboratorio. Se utilizaron como biomarcadores la actividad enzimática de la glutatión-S-transferasa (GST) y la catalasa (CAT) así como el contenido de proteínas (CP), el índice hepatosomático (IHS) y el factor de condición (FC).

Los ensayos de campo se realizaron en el arroyo Las Flores ubicado en la cuenca media del río Luján. Estudios previos demostraron que este arroyo recibe un escaso impacto antrópico aportado por el pastoreo de ganado vacuno, cría de caballos de carrera y algunos cultivos (Feijóo *et al.*, 1999).

Se utilizó como organismo prueba a *C. paleatus*, un teleosteo nativo de hábito bentónico presente en numerosos cuerpos de agua de la llanura pampeana. Esta especie es fácilmente adaptable a los bioensayos de toxicidad y ha sido utilizada en otros estudios evaluando el efecto de las toxinas de cianobacterias (Cazenave *et al.*, 2006).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Organismos prueba

Se utilizaron ejemplares de *C. paleatus* ( $n = 40$ ) con un peso corporal de  $6,8 \pm 0,2$  g y una longitud total de  $7,2 \pm 0,5$  cm. Los ejemplares fueron recolectados de arroyos con escaso impacto de la actividad antropogénica cercanos a la UNLu y se trasladaron a nuestro laboratorio donde permanecieron en condiciones controladas por lo menos una semana.

### Diseño Experimental

Se evaluó el efecto de una dosis subletal de  $\beta$ -naftoflavona bajo condiciones de campo y laboratorio. Los ensayos de campo y laboratorio fueron realizados en forma contemporánea en época invernal. Para ambas condiciones, se determinaron dos grupos: control (C) y experimentales ( $\beta$ ), asignando a cada uno 10 peces al azar. Los individuos del primer grupo recibieron una dosis de 50 mg de  $\beta$ -naftoflavona/kg de peso corporal (p.c.) disuelta en aceite de maíz. Dicha dosis se administró por medio de una única inyección intraperitoneal (10ml/kg p.c.). Los individuos control fueron inyectados con aceite de maíz. Tanto el grupo control como aquellos individuos inyectados con BNF se dividieron en dos subgrupos: campo (C-ca y  $\beta$ -ca) y laboratorio (C-la y  $\beta$ -la). Todos los peces fueron adaptados previamente duran-

te una semana y fueron mantenidos en acuarios de 20 L con flujo continuo de agua potable no clorada (25 ml/min), manteniendo una densidad de carga de 1,0 g/L. La temperatura fue fijada en  $15 \pm 1$  °C y el fotoperíodo en 8h luz/16h oscuridad. Los peces fueron alimentados diariamente con el 1% del peso corporal promedio con alimento comercial con la siguiente composición: proteína cruda 47%, fibras 2%, humedad 10%, cenizas 13%.

En el ensayo de campo los peces permanecieron sumergidos en jaulas en un sitio libre de contaminantes (arroyo Las Flores) y en el de laboratorio se mantuvieron las condiciones de la preadaptación. Al término de 48 h todos los animales fueron sacrificados y procesados.

### **Preparación de las muestras biológicas**

Luego del período experimental, los peces fueron llevados al laboratorio en donde se los anestesió sumergiéndolos en agua a 0 °C durante 5 min. Se registró su peso corporal y se midió la longitud total. Luego los animales fueron sacrificados por medio de una incisión en la columna vertebral por detrás del opérculo, procediendo a la extracción del hígado y registrando el peso del mismo. Las muestras se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento. Luego fueron homogeneizadas individualmente según Nilsen *et al.* (1998) con buffer pH 7,4 (0,1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0,15M KCl; 1mM EDTA; 1mM DTT; 10% v/v glicerol) utilizando homogenizador teflón-vidrio hasta obtener desintegración total del tejido. Los homogenatos se centrifugaron a 10.000g durante 15 min., a 4 °C, se descartó el pellet y se separó la fracción post mitocondrial (PMS) que posteriormente fue utilizada en la determinación de los parámetros bioquímicos.

### **Índices morfométricos y parámetros bioquímicos**

Para cada individuo se determinaron los siguientes índices morfométricos: el factor de condición (FC) el cual fue calculado como el (p.c. (g)/longitud total<sup>3</sup> (cm<sup>3</sup>))\*100 (Bagenal y Tesch, 1978) y el índice hepatosomático (IHS) como el (peso del hígado (g)/p.c. (g))\*100 (Sloof *et al.*, 1983).

Para cada PMS se determinaron los siguientes parámetros bioquímicos: actividades enzimáticas de la catalasa y la glutatión-S-transferasa así como también el contenido de proteínas totales.

La determinación de la actividad de la catalasa se basó en la desaparición en el tiempo del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 240 nm y 25 °C según Beers y Sizer (1952). La mezcla de reacción contenía una alícuota del PMS en buffer fosfato de sodio pH 7,2 (0,05 M) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  20  $\mu\text{M}$ . La actividad de la enzima fue expresada como  $\mu\text{moles}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumidos por minuto por mg de proteínas totales.

La actividad de la glutatión-S-transferasa fue medida por espectrofotometría de acuerdo con Habig *et al.* (1974), utilizando como sustrato el 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) el cual es conjugado por las diferentes isoformas de la GST en presencia del glutatión reducido (GSH) que absorbe a una longitud de onda de 340 nm. Las condiciones del ensayo fueron las siguientes: buffer fosfato de sodio pH 6,5 (0,1M), 10 mM GSH y CDBN 20 mM. La actividad enzimática se evaluó a 25 °C y se expresó como  $\mu\text{moles}$  de GS-CDBN formados por minuto por mg de proteínas.

El contenido de proteínas totales fue determinado por el método de Lowry *et al.* (1951) utilizando sero-albúmina bovina como estándar de referencia y fue expresado como mg de proteínas por g de tejido fresco.

### **Análisis estadístico**

Por medio de la prueba de Kolmogorov-Smirnov y el de Levene se evaluó la normalidad y homogeneidad de varianza de los datos obtenidos. Las comparaciones entre los grupos experimentales y el control se evaluaron mediante ANOVA ( $p < 0,05$ ) y se aislaron las diferencias entre grupos mediante comparaciones múltiples que se realizaron con la prueba de Tukey (Zar, 1996).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Durante el período de ensayo no se registró mortalidad de los individuos en ninguno de los grupos experimentales y se comprobó que la dosis ensayada de BNF fue tolerada. Esto concuerda con estudios previos realizados en nuestro laboratorio con *C. paleatus* (Luque *et al.*, 2006) y con *Cyprinus carpio*, utilizando la misma dosis y similares condiciones experimentales (Ascar y de la Torre, 2005).

Durante el período experimental los peces de campo permanecieron en el arroyo Las Flores donde se registró una tem-

Estación del año	Invierno	Verano
Parámetros		
Temperatura (°C)	11,2	22,0
pH	7,86	7,75
Conductividad ( $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ )	956	760
Oxígeno disuelto ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	8,21	2,00
Fósforo reactivo soluble ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	0,31	0,03
Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	0,021	0,016
Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	0,030	0,101
Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	9,60	6,48
Bacterias coliformes ( $\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	74	320

Los valores que se informan corresponden a los parámetros fisicoquímicos del agua del sitio estudiado del arroyo Las Flores reportados por Feijoó et al. (1999).

**Tabla 1.** Valores de referencia de parámetros fisicoquímicos del arroyo Las Flores.

peratura de 13 °C, pH 7,7 y oxígeno disuelto 7,5 mg/L. Estos datos fueron comparables con los valores de referencia obtenidos por Feijoó et al. (1999) durante la misma estación del año (Tabla 1). Por su parte en el laboratorio los animales estuvieron expuestos a condiciones simuladas de época invernal 15 °C, pH 8,2 y a un flujo continuo con agua de red que garantizó valores superiores al 60% de saturación de oxígeno disuelto.

Respecto a los parámetros bioquímicos evaluados, se detectó un aumento significativo en la actividad de la GST en los peces  $\beta$ -ca respecto a su control de campo (31,6%). También se observó un incremento significativo del 39% en la actividad de la misma enzima en los peces  $\beta$ -la respecto a los controles mantenidos en las mismas condiciones experimentales (C-la) (Ta-

bla 2). Estos resultados concuerdan con estudios previos donde se ha reportado una inducción de la actividad de la GST frente a la exposición de otros teleosteos a contaminantes orgánicos tanto en ensayos a campo con jaulas sumergidas (Beyer et al., 1996; van der Oost et al., 1998) como en laboratorio (van der Oost et al., 2003; Ascar y de la Torre, 2005). Por otro lado, Fenet et al. (1998) reportaron que la variación de actividad de la GST fue especie dependiente. Así observaron un aumento significativo de la actividad de esta enzima en *Onchorynchus mykiss* a los siete días de haber sido inyectados con la misma dosis de BNF que la utilizada en este trabajo (50mg/kg p.c), mientras que para *Anguilla anguilla* no detectaron diferencias.

La actividad de la CAT en los peces de campo inyectados con BNF se incrementó en un 59,7% respecto a controles bajo las mismas condiciones experimentales (Tabla 2). Resultados similares han sido reportados por Stephensen et al. (2000) y Stanic et al. (en prensa) quienes realizaron estudios a campo en ambientes contaminados con *Myoxocephalus scorpius* y *Acipenser ruthenus* L. respectivamente observando un incremento en la actividad de la CAT en los sitios contaminados respecto al lugar de referencia. Por el contrario, van der Oost et al. (1998) luego de exponer en jaulas ejemplares de *C. carpio* en aguas contaminadas con compuestos orgánicos por un período prolongado no observaron modificaciones para este parámetro en particular.

Parámetros biomarcadores	Campo		Laboratorio	
	C-ca	$\beta$ -ca	C-la	$\beta$ -la
Glutación-S-transferasa (imoles GS-CDNB formados/min/mg prot.)	0,19 $\pm$ 0,01 (10)	0,25 $\pm$ 0,01*# (10)	0,16 $\pm$ 0,02 (10)	0,23 $\pm$ 0,02* (10)
Catalasa (i moles H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> consumidos/min/mg prot.)	119,9 $\pm$ 10,1 (10)	191,7 $\pm$ 11,1*# (10)	107,6 $\pm$ 11,1 (10)	161,9 $\pm$ 29,09 (10)
Contenido de proteínas (mg/g tejido fresco)	83,66 $\pm$ 2,74 (10)	72,68 $\pm$ 2,96* (10)	87,11 $\pm$ 2,53 (10)	76,12 $\pm$ 5,65 (10)
Factor de condición	1,88 $\pm$ 0,04 (10)	1,86 $\pm$ 0,07 (10)	1,86 $\pm$ 0,05 (10)	1,83 $\pm$ 0,04 (10)
Índice hepatosomático	1,24 $\pm$ 0,11 (10)	0,98 $\pm$ 0,04 (10)	1,29 $\pm$ 0,10 (10)	1,24 $\pm$ 0,12 (10)

C-ca y C-la: peces inyectados con aceite de maíz que permanecieron durante 48 h en el arroyo Las Flores y en condiciones de laboratorio respectivamente;  $\beta$ -ca y  $\beta$ -la: peces inyectados con una dosis subletal de  $\hat{a}$ -naftoflavona que permanecieron durante 48 h en el arroyo Las Flores y en condiciones de laboratorio respectivamente. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM. Las diferencias estadísticas significativas entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA ( $p < 0,05$ ) y comparaciones múltiples Prueba de Tukey. (\*) indica diferencias respecto a controles de laboratorio; (#) indica diferencias respecto a controles de campo.

**Tabla 2.** Respuesta de biomarcadores de *Corydoras paleatus* frente a una dosis subletal de BNF en condiciones experimentales de campo y laboratorio.

El empleo de la actividad de la GST y la CAT como biomarcadores ha sido ampliamente documentado por diversos autores tanto en ensayos de campo como de laboratorio. En este sentido van der Oost *et al.* (2003) efectuaron una revisión de dichos estudios detectando que el incremento significativo de la actividad de la GST ocurrió en un 33% de los trabajos de campo y de laboratorio analizados; respecto a la CAT, el incremento de la actividad estuvo dado principalmente en los estudios de campo (55%).

Dentro de las alteraciones reportadas por exposición a xenobióticos también se encuentran las producidas a nivel hepático en el contenido tisular de proteínas. Reddy *et al.* (1991) evaluaron en *Cyprinus carpio* los efectos adversos producidos por la exposición a concentraciones subletales de malation y observaron una disminución significativa del contenido de proteínas totales sugiriendo la existencia de una alta actividad hidrolítica de las proteínas. De igual forma de la Torre *et al.* (2000) reportaron una disminución significativa en dicho parámetro luego de la exposición subletal a cadmio de juveniles de *C. carpio* interpretando dicha respuesta como un indicador fisiológico de la adaptabilidad de los peces para compensar el estrés. En nuestro caso, la exposición de *C. paleatus* a BNF no provocó cambios significativos respecto a sus controles respectivos aunque se observó para ambos casos (campo y laboratorio) una tendencia a la disminución del contenido tisular de proteínas. Esta tendencia se vio incrementada al comparar el efecto de la BNF de los individuos de campo respecto a los controles de laboratorio. Estos resultados indicarían la existencia de un efecto modulador de la respuesta cuando las condiciones del ensayo no son estandarizadas.

Respecto a los parámetros morfométricos evaluados (FC e IHS) no se observaron diferencias significativas entre los peces (β) y los controles tanto en condiciones de campo como en el laboratorio (Tabla 2). Por su parte, Fernandez-Jover *et al.* (2007) y Tejeda-Vera *et al.* (2007) reportaron un incremento de ambos parámetros en trabajos de exposición en jaulas y de recolección de peces respectivamente al comparar las respuestas en los sitios contaminados con compuestos orgánicos respecto a lugares prístinos de referencia. Cabe señalar que el aumento

del IHS en los peces puede estar asociado a la exposición de poluentes orgánicos. Al respecto, Dong-Hyuk y Adams (2007) atribuyeron como una posible causa de incremento de este índice al aumento del tamaño del hígado debido a un incremento de carbohidratos en la dieta así como al aumento de la actividad enzimática debido a la detoxificación de estos compuestos.

Comparando nuestros resultados de campo con los de laboratorio debe destacarse que no se detectaron diferencias entre controles en ninguno de los parámetros estudiados.

Al evaluar el efecto del HAP ensayado se detectaron respuestas diferenciales entre los peces experimentales de campo y los controles en varios de los parámetros analizados. Sin embargo, las respuestas de los peces fueron mas evidentes en condiciones de campo al compararlas con los controles de laboratorio (β-ca vs C-la). En este sentido se registró un incremento en la actividad de la GST y CAT en un 51,5% y 78% respectivamente, mientras que las diferencias con los controles de campo fueron del 31,6% y 59,7%. Por otra parte, se observó una disminución del 16,6% en el contenido de proteínas hepáticas sin detectarse diferencias significativas respecto a su control de campo. Estas diferencias podrían atribuirse a la acción conjunta de diferentes variables fisicoquímicas y biológicas presentes sólo en condiciones de campo.

Por último, las actividades hepáticas de GST y CAT de *C. paleatus* exhibieron una adecuada capacidad biomarcadora frente a la β-naftoflavona (un HAP modelo) evidenciando que podrían ser utilizadas en la evaluación de la calidad de cuerpos de agua contaminados con HAPs. A su vez, los ensayos a campo demostraron ser de gran utilidad ya que en nuestro caso demostraron que las condiciones ambientales pueden modificar las respuestas de los biomarcadores; esto último quedó reflejado principalmente en la actividad de la GST y CAT. De igual forma, nuestros resultados evidenciaron que *C. paleatus* es una especie nativa susceptible de ser empleada como organismo de prueba en programas de monitoreo ecotoxicológico acuático.

## AGRADECIMIENTOS

Se contó con el apoyo económico del CONICET, del ANPCyT-PICT 2002 y del

Dpto. Cs. Básicas de la UNLu así como con la colaboración de la Srta. Rocío Luque en las tareas de campo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ascar, M.I. y F.R. de la Torre.** 2005. Biomarcadores hepáticos de la carpa (*Cyprinus carpio* L.): respuestas antioxidantes inducidas por la ̑-naftoflavona, un hidrocarburo aromático policíclico. *Biología Acuática*, 22: 19-28.
- Bagenal, T.B y F.W. Tesch.** 1978. Methods for assessment of fish production in fresh waters. En: Bagenal, T.B (Ed), Age and growth, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 101-136.
- Beers, R.F y I.W. Sizer.** 1952. A Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 195: 133-140.
- Beyer, J., M. Sandvik, K. Hylland, E. Fjeld, E. Egaas, E. Aas, J.U. Skare y A. Goksoyr.** 1996. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sorfjorden, Norway. *Aquatic Toxicology*, 36: 75-98.
- Cazenave, J., M. A. Bistoni, S. F. Pesce y D. A.Wunderlin.** 2006. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquatic Toxicology*, 76: 1-12.
- Colombo, J.C., A. Barreda, C. Bilos, N. Cappelletta, S. Demichelis, P. Lombardia, M.C. Migoya, C. Skorupka y G. Suarez.** 2005. Oil spill in the Río de la Plata estuary, Argentina: 1. Biogeochemical assessment of waters, sediments, soils and biota. *Environmental Pollution*, 134: 277-289.
- de la Torre, F.R., A. Salibián y L. Ferrari.** 2000. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. *Environmental Pollution*, 109: 177-282.
- Dong-Hyuk, Y. y S. M. Adams.** 2007. Assessing effects of stress across levels of biological organization using an aquatic ecosystem health index. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 286-295.
- Feijó, C., A. Giorgi, M. E. García y F. Momo.** 1999. Temporal and spatial variability in streams of a pampean basin. *Hydrobiologia*, 394: 41-52.
- Fenet, H., C. Casellas y J. Bountoux.** 1998. Laboratory and field-caging studies on hepatic enzymatic activities in European eel and Rainbow trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40: 137-143.
- Fernandez-Jover, D., J. A. Lopez Jimenez, P. Sanchez-Jereza, J. Bayle-Sempere, F. Gimenez Casalduero, F. J. Martinez Lopez y T. Dempster.** 2007. Changes in body condition and fatty acid composition of wild Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*, Steindachner, 1868) associated to sea cage fish farms. *Marine Environmental Research*, 63: 1-18.
- Habig, W. H., M. J. Pabst y W. B. Jakoby.** 1974. Glutathione-S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249: 7130-7139.
- Jifa, W., Y. Zhiming, S. Xiuxian y W. You.** 2006. Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabrax japonicus*) exposed to benzo[a]pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65: 230-236.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall.** 1951. Protein measurements with Folin phenol reagent. *Journal of Biological and Chemistry*, 193: 265-275.
- Luque, R. del P., P. Scarcia y F.R. de la Torre.** 2006. Respuestas bioquímicas y fisiológicas de un teleosteo nativo (*Corydoras paleatus*). Res. XXV Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología: 35.
- Nilsen, B.M., K. Berg y A. Goksoyr.** 1998. Induction of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish. A biomarker for environmental pollution. *Methods in Molecular Biology*, 107: 423-438.
- Reddy, P.M. y G.H. Philip.** 1991. Hepato Toxicity of malathion on the protein metabolism in *Cyprinus carpio*. *Acta Hydrochimica hydrobiologica* 19: 127-130.
- Sloof, W., C. F. Van Kreijl y A. J. Baars.** 1983. Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquatic Toxicology*, 4: 1-14.
- Stanic, B., N. Andric, S. Zoric, G. Grubor-Lajsic y R. Kovacevic.** En prensa. Assessing pollution in the Danube River near Novi Sad (Serbia) using several biomarkers in sterlet (*Acipenser ruthenus* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
- Stephensen, E., S. Jorundur, J. Sturve, G. Ericson, M. Adolfsson-Erici, L. Forlin.** 2000. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquatic Toxicology*, 48: 431-442.
- Tejeda-Vera, R., E. López-López y J. E. Sedeño-Díaz.** 2007. Biomarkers and bioindicators of the health condition of *Ameba splendens* and *Goodea atripinnis* (Pisces: Goodeidae) in the Ameba River, Mexico. *Environment International*, 33: 521-531.
- van der Oost, R., C. Lopes, H. Komen, K. Satumalay, R. van den Bos, H. Heida y N. P. E. Vermeulen.** 1998. Assessment of Environmental Quality and Inland Water Pollution Using Biomarker Responses in Caged Carp (*Cyprinus carpio*): Use of a Bioactivation: detoxication Ratio as a Biotransformation Index (BTI). *Marine Environmental Research*, 46: 315-319.
- van der Oost, R., J. Beyer y N. P. E. Vermeulen.** 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.
- Yin, Y., H. Jia, Y. Sun, H. Yu, X. Wang, J. Wu y Y. Xue.** 2007. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 145: 288-293.
- Zar, J.H.** 1996. *Biostatistical Analysis*, third ed. Prentice Hall, N.J. 662pp.