



The Biologist (Lima)



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

BEHAVIOR OF REFUGE AND ACTIVITY OF THE CEREBRAL ACETYLCHOLINESTERASE IN *GAMBUSIA PUNCTATA* (POEY, 1854) (*POECILIIDAE*) BY BIOAVAILABLE LEAD

COMPORTAMIENTO DE REFUGIO Y ACTIVIDAD DE LA ACETILCOLINESTERASA CEREBRAL EN *GAMBUSIA PUNCTATA* (POEY, 1854) (*POECILIIDAE*) POR PLOMO BIODISPONIBLE

George Argota-Pérez¹; Irela Y. Pérez-Andrés²; José Iannacone^{3,4};
Lorena Alvaríño³ & Rigoberto Fimia-Duarte⁵

¹ Centro de Investigaciones Avanzadas y formación Superior en Educación, Salud y Medio Ambiente "AMTAWI", Perú.
george.argota@gmail.com

² Universidad de Ciencias Médicas. Centro de Toxicología y Biomedicina "TOXIMED". Santiago de Cuba, Cuba.
irela.perez@infomed.sld.cu

³ Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), Perú. joseiannacone@gmail.com

⁴ Laboratorio de Cordados. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma (URP), Perú.

⁵ Facultad de Tecnología de Salud «Julio Trigo López». Universidad de Ciencias Médicas "Dr. Serafín Ruiz de Zárate Ruiz". Villa Clara, Cuba. rigobertofd@infomed.sld.cu

ABSTRACT

The purpose of the study was to evaluate the behavior of shelter and the activity of cerebral acetylcholinesterase (AChE-cerebral, EC: 3.1.1.7) in the species *Gambusia punctata* (Poey, 1854) by bioavailable lead. The water matrix of the San Juan ecosystem of Santiago de Cuba-Cuba was sampled by selecting a composite sample (1: 1: 1) from three points corresponding to the lower part of this ecosystem. Then the reaction time-refuge of *G. punctata*, the activity of the AChE-brain by action of the bioavailable lead concentration for the control and experimental treatment group was tested for 21 days at 25 °C. The reaction-refuge time was delayed and the enzymatic activity of the AChE-brain was elevated. A greater bioaccumulation of brain Pb was observed in the experimental group. It is concluded that the refuge behavior was possibly reduced due to the increase in the activity of the AChE-cerebral enzyme, according to bioaccumulation of the Pb, indicating a biological anomaly.

Keywords: cerebral acetylcholinesterase – ethology – *Gambusia punctata* – lead

RESUMEN

El propósito del estudio fue evaluar el comportamiento de refugio y la actividad de la acetilcolinesterasa cerebral (AChE-cerebral; EC: 3.1.1.7) en la especie *Gambusia punctata* (Poey, 1854) ante concentraciones de plomo biodisponible. Se muestreó la matriz agua del ecosistema San Juan de Santiago de Cuba-Cuba seleccionando, una muestra compuesta (1:1:1) de tres puntos correspondientes a la parte baja de este ecosistema. Luego se ensayó durante 21 días a 25°C, el tiempo de reacción-refugio de *G. punctata*, la actividad de la AChE-cerebral por acción del plomo biodisponible para el grupo de tratamiento control y experimental. El tiempo de reacción-refugio fue retrasado y la actividad enzimática de la AChE-cerebral fue elevada. Se observó, mayor bioacumulación del Pb cerebral en el grupo experimental. Se concluyó que el comportamiento de refugio estuvo disminuido posiblemente, al aumento de la actividad de la enzima AChE-cerebral, según bioacumulación del Pb, indicando anomalía biológica.

Palabras clave: acetilcolinesterasa cerebral – etología – *Gambusia punctata* – plomo

INTRODUCCIÓN

El vertimiento de efluentes con alta presencia de elementos químicos provoca eutrofización en los ecosistemas acuáticos, disrupción endocrina que inducen a la feminización en peces machos (Pettersson *et al.*, 2006), madurez sexual retrasada (Lars *et al.*, 2006) y efectos bioacumulativos (Zargar *et al.*, 2017), entre otros. Los metales como elementos químicos, alteran la composición físico-química de la columna de agua y los sedimentos, además, perjudican el valor biológico de las poblaciones y comunidades en los ecosistemas (Richetti *et al.*, 2011; Sabullah *et al.*, 2015; Ching *et al.*, 2016; Kalogianni *et al.*, 2017).

Para evaluar el valor biológico en los ecosistemas, es necesario establecer un enfoque integrado de monitoreo ambiental sobre los propios parámetros físico-químicos de calidad en forma simultánea con el uso de algunos indicadores biológicos (Costa *et al.*, 2017), como pueden ser el coeficiente de condición (Jurajda, 2009), reproducción mediante el índice gonadosomático (Marcogliese & Pietrock, 2017), tolerancia y resistencia hacia la parasitosis (Sitja, 2008; Shah *et al.*, 2014), citotoxicidad y alteración del sistema inmunológico de los peces (Risjani *et al.*, 2014), entre otros.

El pez *Gambusia punctata* (Poey, 1854) (*Poeciliidae*) se distribuye de forma natural en los ambientes lóticos de Cuba, formando parte del

control biológico contra larvas de culicidos y pueden ser empleado como un biomonitor a sustancias tóxicas como son los metales pesados (Argota *et al.*, 2016; Bourzat *et al.*, 2017).

Los biomarcadores enzimáticos son ampliamente usados en los ecosistemas acuáticos para evaluar la exposición y el efecto de los tóxicos sobre los peces de modo que, pueden ser considerados como herramientas de advertencia temprana a la contaminación (Torre *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2009; Sabullah *et al.*, 2015). Al ser expuestos los organismos vertebrados e invertebrados a la contaminación, la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE; EC: 3.1.1.7), está entre los marcadores más empleados en el ambiente acuático (Vieira *et al.*, 2009; Richetti *et al.*, 2011; Sabullah *et al.*, 2015; Bonansea *et al.*, 2016; Rani *et al.*, 2017).

La AChE cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina en colina y ácido acético sobre la sinapsis colinérgica en el sistema nervioso (Jebali *et al.*, 2013). Esta enzima puede ser inhibida por plaguicidas organofosforados y carbamatos así como, por metales pesados (Rendón-von Osten *et al.*, 2005; Jebali *et al.*, 2013; Bonansea *et al.*, 2016; Fergani & Arab, 2017). La presencia de algunos plaguicidas y metales como el plomo en órganos dianas de los peces pueden alterar la actividad enzimática de la AChE en hígado, músculo y cerebro (Rao *et al.*, 2005; Rendón-von Osten *et al.*, 2005; Jebali *et al.*, 2013; Al-ghais, 2013; Argota *et al.*, 2013ab). Sabullah *et al.* (2015), resumen el uso

de la AChE para el monitoreo ecotoxicológico de metales pesados en varias especies de peces.

El plomo es un metal pesado persistente tiene como importantes fuentes de emisión antropogénica, la actividad minera, pinturas, agricultura, industrias de alimentos y vidrio entre otras, las cuales vierten estos químicos de forma directa o indirectamente hacia las aguas (Authman *et al.*, 2015; Sabullah *et al.*, 2015). El plomo tiene efectos bien conocidos en la salud sobre el sistema de neurotransmisores y es un probable carcinógeno a los humanos. Además, es conocido el rol del aumento de esta enzima en enfermedades degenerativas como el Alzheimer y en poblaciones envejecidas (Richetti *et al.*, 2011).

Efectos no letales por exposición bioacumulativa al plomo pueden ser evaluados mediante bioensayos consiguiendo describirse finalmente, algunas respuestas específicas como las conductuales (Steffens *et al.*, 2015; Hansen & Unruh, 2017). El comportamiento locomotorio en peces puede ser afectado por diversos contaminantes, ocasionando disminución en la capacidad de los peces para escapar de los depredadores, capturar presas y en la reproducción (Rao *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2009; Sabullah *et al.*, 2015). Variaciones en el conducta como el comportamiento natatorio en peces se encuentran entre los biomarcadores conductuales más usados a nivel individual, debido a que esta respuesta integra muchos procesos celulares (Bonansea *et al.*, 2016).

El propósito de este estudio fue evaluar el comportamiento de refugio y actividad de la acetilcolinesterasa cerebral en *G. punctata* (*Poeciliidae*) por plomo cerebral biodisponible.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizó una muestra compuesta (proporción 1:1:1) de la matriz agua correspondiente a tres puntos de exposición (A- X: 607810, Y: 150770; B- X: 607350, Y: 149645; C- X: 606 945, Y: 147516) en la parte baja del ecosistema San Juan de Santiago de Cuba, Cuba. Previamente, ejemplares de la especie *G. punctata* fueron aclimatados 24h

antes del estudio (sin alimentación y oxigenación constante). Se colocaron 40 individuos en dos peceras de cristal (cada una con réplica), conteniendo un volumen inicial de agua no contaminada ($1\text{L}\cdot\text{individuo}^{-1}$). Luego se ensayó la muestra compuesta ($1,5\text{L}\cdot\text{individuo}^{-1}$) por 21 días, bajo temperatura controlada del agua a 25°C , midiendo al final del ensayo, el tiempo de comportamiento de refugio de los individuos mediante la introducción de una varilla esterilizada (vidrio), observando el tiempo de la conducta en huida-refugio de los peces hacia las plantas y piedras que fueron ubicadas en las peceras, la actividad de la acetilcolinesterasa cerebral (AChE-cerebral) y finalmente la concentración de Pb cerebral.

Para la medición de la temperatura se utilizó el termómetro: TDS Meter 3 - Digital Water Quality Tester mientras que, la concentración de Pb en cerebro se midió por espectrometría de plasma inductivamente acoplado con vista axial (ICP-AES), realizándose la lectura de las muestras en matriz de digestión ácida (Argota *et al.*, 2016).

La actividad AChE-cerebral ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de tejido) se midió mediante espectrofotómetro (Perkin-Elmer UV/VIS) a 410 nm, realizándose todos los análisis por triplicado. Inicialmente, las muestras se homogenizaron en una solución amortiguadora TRIS/HCL 0,1M, 0,1% Triton pH-8 en el ratio de 1mL por 0,5g de tejido, centrifugándose a 1000 rpm por 12 min (Ellman *et al.*, 1961). Se empleó como sustrato, acetiltiocolina yodada y la detección de la liberación de tiocolina mediante reacción con 5,5-dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (Argota *et al.*, 2013a). Después de 5 min se registró la actividad AChE-cerebral. En el caso del tiempo de reacción se midió con el cronómetro Casio Collection-Digital: HS-3V-1RET.

Análisis estadístico de los datos

Para el tratamiento de los resultados se aplicó como métodos estadísticos, la prueba t-Student para determinar diferencias y estimaciones significativas entre el control y el experimental (Montgomery, 1991). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software profesional: Statgraphics Centurion XVI considerando significativos los resultados, a un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

Ética de la investigación

La eutanasia de los peces se realizó mediante bolsas con hielo que fueron depositadas en diferentes recipientes de cristal con agua tratada, procurando que durante la inmersión de los ejemplares fueran tranquilizados para su disección, análisis de la AChE-cerebral y plomo bioacumulado en cerebro (NRC, 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1 muestra el resumen estadístico del tiempo de reacción ante el estímulo de *G. punctata* de la actividad AChE-cerebral y las concentraciones de Pb en el grupo de tratamiento control y experimental.

Tabla 1. Resumen estadístico del tiempo de reacción ante el estímulo (seg), AChE-cerebral ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$), y Pb-cerebral ($\mu\text{g}/\text{g}$) en *Gambusia punctata* a 25°C por 21 días de exposición.

Estadígrafos	Reacción ante estímulo control	Reacción ante estímulo experimental	AChE control	AChE experimental	Pb control	Pb experimental
promedio	0,98	3,15	127,36	331,29	1,04	1,54
	$\pm 0,04$	$\pm 0,58$	$\pm 1,26$	$\pm 3,22$	$\pm 0,004$	$\pm 0,003$
Coefficiente de variación (%)	4,96	18,63	0,99	0,97	10,52	5,03
IC al 95%	0,90, 1,10	2,0, 4,0	124,87, 129,84	328,80, 333,77	0,75, 1,24	1,25, 1,74
sesgo estandarizado	-0,80	-0,007	-0,48	1,73	-1,18	0,87
Sig. de t de student		*		*		*

*= Indican valores significativos a un nivel de significancia de 0,05.

Dado que el sesgo estandarizado para las determinaciones se encontró entre -2 a +2, se indicó que las distribuciones de los datos correspondieron a la normalidad lo cual, no invalidó la prueba de comparación de medias para el tiempo de reacción ante el estímulo, la AChE-cerebral y concentración de Pb en *G. punctata*. El intervalo de confianza mostró, diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedios del tiempo de reacción ante el estímulo, de la AChE-cerebral y Pb cerebral entre el grupo control y experimental (Tabla 1).

Al finalizar el ensayo se observó que, el tiempo promedio del comportamiento de refugio en la *G. punctata* para el grupo de tratamiento control resultó menor que el grupo de tratamiento experimental, así como mayor actividad de la AChE-cerebral y bioacumulación al plomo en el tratamiento experimental a la misma temperatura pudiendo indicarse su efecto directo en la movilización desde la matriz agua hacia el organismo (Tabla 1).

Se encontró que el tiempo promedio del comportamiento de refugio de *G. punctata* en el grupo control fue menor que en el experimental, observándose en este último, mayor actividad de la AChE-cerebral y acumulación al plomo en el cerebro. Yang *et al.* (2017) observaron, disminución de la respuesta de comportamiento en el pez *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) a concentraciones de cadmio en el agua en comparación al control a 48 h de exposición. De igual forma se observó, disminución de la actividad de la AChE-cerebral con el aumento de la concentración de cadmio en el agua (Yang *et al.*, 2017). En el presente trabajo se observó un patrón diferente, pues hubo mayor actividad de la AChE-cerebral y acumulación al plomo en el cerebro de *G. punctata*. La mayoría de las investigaciones muestra una disminución de la AChE-cerebral con al aumento en la concentración de metales pesados y sitios contaminados a tiempos cortos de exposición (Jebali *et al.*, 2013; Rani *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017). Aunque no se evaluaron concentraciones de otros tóxicos (incluyendo a los

metales) en la muestra de agua integrada (1:1:1) que se expusieron a *G. punctata*, éstos pudieran ocasionar efectos de mezcla con el plomo produciendo, aumento de la actividad de la AChE-cerebral a 21 días de exposición. Şen & Karatuğ (2017) observaron, estimulación de la actividad de la AChE-cerebral con el incremento de las concentraciones de los metales pesados: plomo y selenio en los tejidos de la tilapia *Oreochromis niloticus* (Linneaus, 1758) a 15 días de exposición. El uso de la actividad de la AChE-cerebral es un biomarcador ambiental que requiere, caracterización cuidadosa de las enzimas presentes en la especie íctica como en el tejido del pez, para minimizar la interpretación errada de los resultados (Jebali *et al.*, 2013). Fergani & Arab (2017) señalan que, la actividad de la AChE-cerebral varía dependiendo del sexo, parámetros intrínsecos del pez y del tejido estudiado.

La mayoría de los registros en la literatura señalan que, la disminución de la actividad de la AChE-cerebral por acción de tóxicos ambientales altera el comportamiento natatorio en los peces (Vieira *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2013; Bonansea *et al.*, 2016; Fergani & Arab, 2017). Bonansea *et al.* (2016) expresan que el comportamiento de nado, la hipoactividad como la hiperactividad en los peces puede estar asociada con inhibición de la actividad de la AChE-cerebral a tiempos cortos de exposición. Los resultados hallados muestran, disminución del comportamiento de refugio de *G. punctata* con un aumento de la actividad de la AChE-cerebral a mayor tiempo de exposición de 21 días para una muestra ambiental de río que pudiera tener otros tóxicos en mezcla con el plomo (Yang *et al.*, 2017).

Pouil *et al.* (2017) en su estudio sobre Zn dietético y el subsiguiente organotropismo en los peces, experimentaron con valores de pH en el rango de la neutralidad (7,5 y 8,0), así como con dos niveles de temperatura: 17 °C y 20 °C, hallándose que los parámetros no influyeron en la transferencia de Zn hacia un órgano en particular. Sin embargo, el Zn es un elemento esencial en la vida de los vertebrados donde es regulado por la homeostasia, no siendo así para el plomo, pues no juega un papel biológico reconocido; y aunque no se midió el pH en la muestra compuesta, la temperatura ensayada fue 5 °C superior a la máxima del estudio comparado donde se observó, relación sobre la

bioacumulación al plomo en el cerebro como órgano diana (Biol *et al.*, 2013; Madeira *et al.*, 2013; Luísa *et al.*, 2017).

La exposición a compuestos aromáticos policíclicos (Oropesa *et al.*, 2007) y pesticidas (Topal *et al.*, 2017) en las aguas puede provocar disminución de la AChE-cerebral en peces. Sanches *et al.* (2017) probaron que, el plomo muestra un alto factor de bioconcentración y aunque solo se midió la concentración en tejido biológico y no en el agua, se corrobora lo planteado en el presente estudio.

Resultó valorativo que si la especie *G. punctata* mostró daños y ha sido considerada como biomonitor para la predicción de riesgo en ecotoxicología acuática (Argota & Iannacone, 2017), entonces otras especies más sensibles, podrán manifestar disímiles efectos que se clasificarían desde magnitudes de daños leves hasta severas, incluyendo la propia muerte del organismo.

Sfakianakis *et al.* (2015), señalan que los metales pesados se han asociado con diversas deformaciones en los peces. Boglione *et al.* (2013) indican la aparición de efectos no deseados sobre la tasa de crecimiento, bienestar y morfología externa, así como la supervivencia poblacional (Boglione *et al.*, 2013). Algunas de las deformaciones más comunes se localizan en la columna vertebral (Koumoundouros *et al.*, 2002; Sfakianakis *et al.*, 2006), vejiga natatoria (Divanach *et al.*, 1996) y en las aletas (Favaloro & Mazzola, 2003). Cuando los peces presentan cualquiera de estas deformaciones, sin duda alguna, aumenta la vulnerabilidad en la captura sobre presas, el apareamiento o la protección ante posibles depredadores.

Todo organismo en estado fisiológico normal, manifiesta una respuesta o un patrón de conservación ante cualquier estímulo que represente un peligro donde tal conducta, es condicionada por el sistema nervioso (Bonansea *et al.*, 2016). Georgakopoulou *et al.* (2007) refirieron que, la exposición a metales induce del mismo modo, deformaciones en la región cefálica y no solo son morfológicas externas, pues algunos daños sobre estructuras anatómicas internas también se manifiestan. Una posible respuesta de

los peces cuando presentan daños cerebrales, quizás esté asociada con determinado acto reflejo en forma demorada, pudiendo ser observado tal conducta en los organismos de la especie *G. punctata* que por lo general, en el grupo de tratamiento experimental se mantuvieron en el tercio superior de la columna de agua, siendo dicha conducta no esperada, ya que estos peces suelen quedar únicamente en este nivel, durante la búsqueda de presas (ej.: insectos y microcrustáceos). Bonansea *et al.* (2016) señalan que, los peces ante exposiciones bajas de determinado tóxico, prefieren la parte alta en el acuario y cuando las concentraciones del tóxico son elevadas, entonces prefieren el área superior. Asimismo, la forma percoidea de su cuerpo, les garantiza la pronta huida por competencia del alimento (Argota *et al.*, 2013); además, poder escapar ante cualquier estímulo que represente un peligro de modo que, el tiempo de reacción-refugio en los organismos del grupo de tratamiento experimental fue significativo, atendiendo a los valores encontrados.

Jonge *et al.* (2015) señalaron que, la cuantificación de metales en los tejidos de las especies residentes (como es la *G. punctata* en el ecosistema San Juan) representa una imagen integrada y ecológicamente relevante sobre la biodisponibilidad específica de cualquier metal en un determinado nicho ecológico, existiendo tal condición química en este estudio experimental, ya que hubo bioacumulación del plomo.

Aunque el Pb puede bioacumularse en los organismos acuáticos mediante el agua y la dieta, existen evidencias que la mayor probabilidad sea, a través de las aguas contaminadas (Cretì *et al.*, 2010) siendo evidenciado en el presente estudio. Finalmente, Mager (2011) mencionó que, entre los principales efectos por bioacumulación al plomo en los peces se encuentran los daños hematológicos y neurológicos por cuanto, la concentración elevada de la AChE-cerebral como biomarcador de efecto, indicó este último daño.

Se concluyó que, la disminución etológica de refugio resultó una señal de anomalía ante la concentración de Pb cerebral a la temperatura de 25 °C, lo que se asoció a una actividad no deseada de la enzima AChE-cerebral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-ghais, S.M. 2013. Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. *Marine Pollution Bulletin*, 74: 183–186.
- Argota, P.G.; Argota, C.H. & Fimia, D.R. 2013a. Biomarcadores en la especie *Gambusia punctata* (Poeciliidae) dada las condiciones ambientales del ecosistema San Juan. *Revista Electrónica Veterinaria REDVET*, 14: Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060613/061307.pdf>. Leído el 20 de septiembre del 2017.
- Argota, P.G.; Iannacone, J. & Fimia, D.R. 2013b. Características de *Gambusia punctata* (Poeciliidae) para su selección como biomonitor en ecotoxicología acuática en Cuba. *The Biologist (Lima)*, 11: 229–236.
- Argota, P.G. & Iannacone, J. 2017. Predicción cuantitativa mediante biomarcadores de uso permanente como nuevo criterio para biomonitores en ecotoxicología acuática. *The Biologist (Lima)*, 15: 141–153.
- Argota, P.G.; Argota, C.H. & Iannacone, J. 2016. Exposición bioacumulativa a metales pesados en *Gambusia punctata* y *Gambusia puncticulata* del ecosistema Almendares, La Habana-Cuba. *The Biologist (Lima)*, 14: 339–350.
- Authman, M.M.N.; Zaki, M.S.; Khallaf, E.A. & Abbas, H.H. 2015. Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metals pollution. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 6:4.
- Biol, M.; Aure, M.; Rita, A.; Marta, L.; Tiago, S. P. & Miguel, R. 2013. Physiological and behavioral responses of temperate seahorses (*Hippocampus guttulatus*) to environmental warming. *Marine Biology*, 160: 2663–2670.
- Boglione, C.; Gisbert, E.; Gavaia, P.; Witten, E.; Moren, M.; Fontagné, S. & Koumoundouros, G. 2013. Skeletal anomalies in reared european fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. *Reviews in Aquaculture*, 5(S1): S121–S167.
- Bonansea, R.I.; Wunderlin, D.A. & Amé, M.V.

2016. Behavioral swimming effects and acetylcholinesterase activity changes in *Jenynsia multidentata* exposed to chlorpyrifos and cypermethrin individually and in mixtures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 129:311–319.
- Bourzac, F. G.; Moreno, G. J.C.; González M.A.; Rodríguez, A.J.R. & Picanço, S.R.N. 2017. *Gambusia punctata* (Poeciliidae) as alternative biomodel in oxidative stress evaluation for ecotoxicological and pharmaceutical applications. *Free Radical Biology and Medicine*, 100 (Supp): S98.
- Ching, W.; Herath, G.; Sarker, A. & Masuda, T. 2016. River and fish pollution in Malaysia: A green ergonomics perspective. *Applied Ergonomics*, 57: 80–93.
- Costa, A.D.; Shyama, S.K. & Kumar, M.K.P. 2017. Bioaccumulation of trace metals and total petroleum and genotoxicity responses in an edible fish population as indicators of marine pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142: 22–28.
- Cretì, P.; Trinchella, F. & Scudiero, R. 2010. Heavy metal bioaccumulation and metallothionein content in tissues of the sea bream *Sparus aurata* from three different fish farming systems. *Environmental Monitoring and Assessment*, 165: 321–329.
- Divanach, P.; Boglione, C.; Menu, B.; Koumoundouros, G.; Kentouri, M. & Cataudella, S. 1996. *Abnormalities in finfish mariculture: an overview of the problem, causes and solutions*. In: Chatain, B.; Sweetman, J. & Lavens, P. S.M. (Eds.). *Seabass and Seabream Culture: Problems and Prospects*. European Aquaculture Society, Oostende, Belgium; pp. 45–66.
- Ellman, L.G.; Courtney, D.K.; Andres, V.Jr. & Featherstone, M.R. 1961. A rapid colorimetric of acetylcholinesterase determination. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88–95.
- Favaloro, E. & Mazzola, A. 2003. Meristic variation and skeletal anomalies of wild and reared sharpsnout seabream juveniles (*Diplodus puntazzo*, Cetti 1777) off coastal Sicily, Mediterranean Sea. *Aquaculture Research*, 34: 575–579.
- Fergani, H. & Arab, A. 2017. Effects of pollution on the activity of acetylcholinesterase in the brain and heart of *Barbus setivimensis* (Fish, Cyprinidae) in el Harrach stream (north of Algeria). *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)*, 72:73–82.
- Georgakopoulou, E.; Angelopoulou, A.; Kaspiris, P.; Divanach, P. & Koumoundouros, G. 2007. Temperature effects on cranial deformities in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Applied Ichthyology*, 23: 99–103.
- Hansen, P. & Unruh, E. 2017. Whole-cell biosensors and bioassays. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 77: 1–19.
- Jebali, J.; Khedher, S.B.; Sabbagh, M.; Kamel, N.; Banni, M. & Boussetta, H. 2013. Cholinesterase activity as biomarker of neurotoxicity: utility in the assessment of aquatic environment contamination. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, 13:525–537.
- Jonge, M.; Belpaire, C.; Van Thuyne, G.; Breine, J. & Bervoets, L. 2015. Temporal distribution of accumulated metal mixtures in two feral fish species and the relation with condition metrics and community structure. *Environmental Pollution*, 197: 43–54.
- Jurajda, P. 2009. Invasive gobies in the Danube: invasion success facilitated by availability and selection of superior food resources. *Ecology of Freshwater Fish*, 18: 640–649.
- Kalogianni, E.; Vourka, A.; Karaouzas, I.; Vardakas, L. & Skoulikidis, N.T. 2017. Combined effects of water stress and pollution on macroinvertebrate and fish assemblages in a Mediterranean intermittent river. *Science of the Total Environment*, 603–604: 639–650.
- Koumoundouros, G.; Maingot, E.; Divanach, P. & Kentouri, M. 2002. Kyphosis in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Ontogeny and effects on mortality. *Aquaculture*, 209: 49–58.
- Lars, F.; Hansson, T.; Lindesj, E. & Bignert, A. 2006. Long-term monitoring of the health status of female perch (*Perca fluviatilis*) in the Baltic Sea shows decreased gonad weight and increased hepatic EROD activity. *Aquatic Toxicology*, 79: 341–355.
- Lima, D.; Roque, G.M. & Almeida, E.A. 2013. In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). *Marine Environmental Research*, 91:45–51.

- Luísa, A.; Barbosa, V.; Alves, R.; Custódio, A.; Anacleto, P.; Repolho, T.; Pousão Ferreira P.; Rosa R.; Marques A. & Diniz, M. 2017. Ecophysiological responses of juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to increased temperature and dietary methylmercury. *Science of the Total Environment*, 586:551–558.
- Madeira, D.; Narciso, L.; Cabral, H.N.; Vinagre, C. & Diniz, M.S. 2013. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 166: 237–243.
- Mager, E.M. 2011. *Homeostasis and toxicology of non-essential metals*. In: Wood, C.M.; Farrell, A.P. & Brauner, C.J. (Eds.). *Lead of the fish physiology*. 31B. Academic Press, New York, USA. pp. 185–236.
- Marcogliese, D.J. & Pietrock, M. 2017. Combined effects of parasites and contaminants on animal health: parasites do matter. *Trends in Parasitology*, 27: 123–130.
- Montgomery, C. 1991. *Diseño y Análisis de Experimentos*. Grupo Ed. Iberoamérica S.A de C.V. México DF.
- NRC (National Research Council) of the National Academies. 2017. *Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*. 8^{va} Ed. Comité para la Actualización de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Institute for laboratory Animal Research. Division on Earth and Life Studies. Ediciones UC de Chile. 228 p.
- Oropesa, A.; Pérez, M.; Hernández, D.; García, J.; Fidalgo, L.; López, B.A. & Soler, F. 2007. Acetylcholinesterase activity in seabirds affected by the prestige oil spill on the Galician coast (NW Spain). *Science of the Total Environment*, 372: 532–538.
- Pettersson, M.; Adolffson-Erici, M.; Parkkonen, J. & Fo, L. 2006. Fish bile used to detect estrogenic substances in treated sewage water. *Science of the Total Environment*, 366: 174–186.
- Pouil, S.; Oberhansli, F.; Bustamante, P. & Metian, M. 2017. Dietary Zn and the subsequent organotropism in fish: No influence of food quality, frequency of feeding and environmental conditions (pH and temperature). *Chemosphere*, 183: 503–509.
- Rani, S.; Gupta, R.K. & Yadav, J. 2017. Heavy metal induced alterations in acetylcholinesterase activity of Indian major carps. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5: 818–821.
- Rao, J.V.; Begum, G.; Pallela, R.; Usman, P.K. & Rao, R.N. 2005. Changes in behavior and brain acetylcholinesterase activity in mosquito fish, *Gambusia affinis* in response to the sub-lethal exposure to Chlorpyrifos. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2: 478–483.
- Rendón-von Osten, J.; Ortíz-Arana, A.; Guilhermino, L. & Soares, A.M.V.M. 2005. *In vivo* evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatanensis*) exposed to pesticides. *Chemosphere*, 58: 627–636.
- Richetti, S.K.; D.B. Rosemberg, D.B.; Ventura-Lima, J.; Monserrat, J.M.; Bogo, M.R. & Bona, C.D.. 2011. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *NeuroToxicology*, 32: 116–132.
- Risjani, Y.; Couteau, J. & Minier, C. 2014. Cellular immune responses and phagocytic activity of fishes exposed to pollution of volcano mud. *Marine Environmental Research*, 96: 73–80.
- Sabullah, M.K.; Ahmad, S.A.; Shukor, M.Y.; Gansau, A. J.; Syed, M.A.; Sulaiman, M. R. & Shamaan, N. A. 2015. Heavy metal biomarker: Fish behavior, cellular alteration, enzymatic reaction and proteomics approaches. *International Food Research Journal*, 22: 435–454.
- Sanches, F.J.P.; Caldas, J.S.; Nunes, N.; Osvaldo, F. & Pereira, P. 2017. Toxicity test and Cd, Cr, Pb and Zn bioaccumulation in *Phalloceros caudimaculatus*. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4: 206–211.
- Şen, G. & Karaytuğ, S. 2017. Effects of lead and selenium interaction on acetylcholinesterase activity in brain and accumulation of metal in tissues of *Oreochromis niloticus* (L., 1758). *NEsciences*, 2: 21–32.
- Sfakianakis, D.G.; Georgakopoulou, E.; Papadakis, I.E.; Divanach, P.; Kentouri, A. & Koumoundouros, G. 2006. Environmental determinants of haemal lordosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758).

- Aquaculture, 254, 54–64.
- Sfakianakis, D.G.; Renieri, E.; Kentouri, M. & Tsatsakis, A.M. 2015. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. *Environmental Research*, 137: 246–255.
- Shah, H.B.; Yousuf, A.R.; Chishti, M.Z.; Shahnaz, S. & Ahmad, F. 2014. Trophic status and helminth infracommunities of fish populations in Kashmir Himalayan lakes. *Journal of Helminthology*, 88: 264–271.
- Sitja, A. 2008. Living off a fish: A trade-off between parasites and the immune system. *Fish & Shellfish Immunology*, 25: 358–372.
- Steffens, C.; Klauck, C. R.; Benvenuti, T.; Silva, L. B. & Rodrigues, M.A.S. 2015. Water quality assessment of the Sinos River–RS, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 75: 62–67.
- Topal, A.; Alak, G.; Ozkaraca, M.; Yeltekin, A.C.; Comaklı, S.; Acil, G.; Kokturk, M. & Atamanalp, M. 2017. Neurotoxic responses in brain tissues of rainbow trout exposed to imidacloprid pesticide: Assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, oxidative stress and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 175:186–191.
- Torre, F.R.; Salibian, A. & Ferrari, L. 2007. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of freshwater fish. *Chemosphere*, 68: 1582–1590.
- Vieira, L.R.; Gravato, C.; Soares, A.M.V.M.; Morgado, F. & Guilhermino, L. 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere*, 76: 1416–1427.
- Yang, M.; Ji, L.; Zhang, X.; Fan, Y. & Ren, Z. 2017. The relationship between behavior responses and brain acetylcholinesterase (AChE) activity of Zebrafish (*Danio rerio*) in cadmium stress. *International Journal of Fisheries Science and Research*, 1: 1002.
- Zargar, U.R.; Chishti, M.Z.; Rather, M.I. & Rehman, M. 2017. Biomonitoring potential of a Caryophyllaeid tapeworm: Evaluation of *Adenoscolex oreini* infection level and health status in three fish species of the genus *Schizothorax* across eutrophication and pollution gradients. *Ecological Indicators*, 81: 503–513.

Received October 4, 2017.
Accepted February 9, 2018.