

Libros de **Cátedra**

Principios de Ecotoxicología

Pedro Carriquiriborde (coordinador)

FACULTAD DE
CIENCIAS EXACTAS

e
exactas


EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

PRINCIPIOS DE ECOTOXICOLOGÍA

Pedro Carriquiriborde
(coordinador)

Facultad de Ciencias Exactas



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



Agradecimientos

Agradecemos sinceramente a EDULP por subsidiar la edición del presente libro. A las instituciones que nos brindan lugar de trabajo y nos permiten investigar e impartir los conocimientos vertidos en este libro. A nuestras familias por el apoyo incondicional.

*Hay algo infinitamente reparador en el reiterado ritmo de la naturaleza,
la garantía de que el amanecer llega tras la noche, y la primavera tras el invierno.*

RACHEL LOUISE CARSON, El Sentido del Asombro

Índice

Prefacio	8
-----------------	---

Capítulo 1

Introducción	10
--------------	----

Dr. Pedro Carriquiriborde

PRIMERA PARTE

Los contaminantes en el ambiente y su acumulación en la biota

Capítulo 2

Principales familias de contaminantes, fuentes, distribución y destino ambiental	27
--	----

Dra. Karina Miglioranza

Capítulo 3

Biodisponibilidad, biotransformación, bioacumulación y biomagnificación de los contaminantes	62
---	----

Dr. Pedro Carriquiriborde

SEGUNDA PARTE

Efecto de los contaminantes sobre los organismos

Capítulo 4

Bases sobre los efectos tóxicos inducidos por los contaminantes	94
---	----

Dr. Pedro Carriquiriborde

Capítulo 5

Estrés Oxidativo	116
------------------	-----

Dr. José María Monserrat

Capítulo 6

Neurotoxicidad _____ 126

Dra. Olga Anguiano; Dra. Ana Ferrari

Capítulo 7

Genotoxicidad y carcinogénesis _____ 148

Celeste Ruiz de Arcaute, Milagros Laborde, Sonia Soloneski y Marcelo L. Larramendy

Capítulo 8

Disrupción Endócrina _____ 184

Dr. Gustavo Somoza, Dra. Fabiana Lo Nostro

Capítulo 9

Alteración del Comportamiento _____ 191

Bettina Eissa y Natalia Ossana

TERCERA PARTE

Respuestas a nivel de los ecosistemas

Capítulo 10

Efectos de los contaminantes sobre poblaciones _____ 209

Dr. Federico Rimoldi

Capítulo 11

Efectos sobre las comunidades biológicas _____ 232

Dra. Ana María Gagneten, Dra. Luciana Regaldo

CUARTA PARTE

Herramientas de la Ecotoxicología

Capítulo 12

Bioensayos de toxicidad _____ 268

Dra. Leticia Peluso

Capítulo 13

Biomarcadores de Contaminación _____ 291

Dra. Valeria Amé, Dra. Jimena Cazenave, Dra Mirta Menone

Capítulo 14

Evaluación de Riesgo Ecotoxicológica _____ 309

Dr. Pablo Demetrio

Los Autores _____ 336

Prefacio

Este libro ha surgido como una iniciativa abordada como Profesor a cargo de la asignatura de Ecotoxicología y Evaluación de Riesgo de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata en respuesta a la demanda que año tras año han venido planteándonos los estudiantes que transitan el curso, respecto a poder contar con un libro de texto que los guíe en el estudio de la materia dado que los textos disponibles en español son escasos. Además, tal demanda no parece ser única de los estudiantes de UNLP, si no que la misma aparece como una necesidad generalizada en diferentes universidades de Argentina y otros países de habla hispana, por lo cual este libro se ha presentado como una gran oportunidad para convocar a colegas de diferentes casas de estudio de Argentina y Latinoamérica con experticia en diferentes áreas de la Ecotoxicología, de modo tal de, conjuntamente, elaborar un libro de texto universitario que brinde a los estudiante los fundamentos básicos de la disciplina desde la diversidad de visiones proporcionada por las diferentes escuelas de las que provienen cada uno de los autores convocados. Otro de los aspectos destacables, y que ha sido atractivo para abordar la empresa, es la forma en que EDULP publica sus libros, en plataforma online y completamente gratuita, hecho que posibilita el acceso al texto no sólo a estudiantes de la UNLP, sino de cualquier lugar del mundo que estén interesados en introducirse en la materia.

El texto se estructura de manera tal de cubrir los temas más relevantes de la disciplina, organizado en catorce capítulos agrupados en tres secciones. En primer lugar, un capítulo introductorio. Luego, una sección vinculada a reconocer los principales contaminantes ambientales y los factores que determinan la exposición de los organismos y los mecanismos por los cuales ingresan y se acumulan en los mismos. A continuación, otra sección relacionada con los diferentes tipos de efectos que los contaminantes ambientales pueden inducir en los organismos, desde los mecanismos de acción hasta las consecuencias sobre sus capacidades biológicas y como ello luego puede afectar los niveles ecológicos de las poblaciones y las comunidades. Finalmente, la tercera sección aborda las herramientas más características de la disciplina, como son los bioensayos de toxicidad, los biomarcadores y la evaluación de riesgo ecológico. Cada capítulo se ha intentado organizar abordando cada tema primero desde los aspectos teóricos y generales, luego presentando ejemplos de caso de investigación generados por cada uno de los propios autores y finalmente brindando alguna herramienta que los estudiantes puedan utilizar, como por ejemplo para realizar en un trabajo práctico.

Es mi deseo que este libro cubra las expectativas de los estudiantes y les proporcione un material de estudio que los introduzca en la ecotoxicología de una forma amena y atractiva. Como

primera edición, seguramente haya muchas cosas para mejorar hacia el futuro, pero realmente es una gran satisfacción haber podido reunir en este texto a un número importante de colegas no sólo de la ciudad de La Plata, sino también de diferentes lugares del país y de la región. Con algunos he tenido la oportunidad de colaborar previamente y con otros no, pero igualmente se han brindado a contribuir con esta obra con el esfuerzo que ello conlleva y que no siempre es justamente reconocido en el ámbito científico. A todos ellos quiero aprovechar para expresarles mi más sincero agradecimiento.

Dr. Pedro Carriquiriborde

CAPÍTULO 1

Introducción a la Ecotoxicología

Pedro Carriquiriborde

Surgimiento de la Ecotoxicología

Desde su origen en el planeta tierra, la vida ha evolucionado adaptándose a las condiciones del ambiente. Pocas son las especies que, como el ser humano, han logrado invertir esa lógica y adaptar el ambiente a sus necesidades. Desde los inicios, los ancestros de la especie humana fueron capaces de construir herramientas rudimentarias, dominar el fuego o construir su vestimenta. Justamente al dominio del fuego se le han atribuido los primeros casos de contaminación prehistórica intramuros. Posteriormente, los propios seres humanos lograron domesticar plantas y animales, dominar los metales y construir aldeas y ciudades. El crecimiento poblacional y el hacinamiento en las ciudades, sumado a las pobres condiciones de alimentación e higiene, condujeron en las Edad Media a la peste negra, la mayor pandemia que azotó Europa en el Siglo XIV y que acabó con más de un tercio de su población y el 20% de la población mundial de la época.

Luego, las transformaciones económicas, tecnológicas y sociales permitieron un crecimiento y distribución de la población humana y una capacidad de extraer recursos y energía del ambiente sin precedentes. Con una concepción respecto a que los recursos eran inagotables, rápidamente se empezaron a manifestar los primeros problemas de **degradación ambiental** a través de la agricultura, la silvicultura, la minería, la fundición y otras actividades. En 1723, Hans Carl von Carlowitz acuña el término “sustentabilidad” en un tratado comprensivo sobre silvicultura “*Sylvicultura Oeconomica*” en respuesta a la desaparición de los bosques de Saxony en Alemania, como producto de la minería indiscriminada. Sin embargo, el problema siguió potenciándose con la revolución industrial en el siglo XVIII a tal punto que, a principios del Siglo XX, fue necesario la promulgación de las primeras leyes de conservación, tales como la Ley Lacey aprobada en 1900 en EEUU para prohibir el tráfico de flora y fauna silvestres.

El crecimiento de las urbanizaciones y la intensificación de la industrialización condujo, a su vez, la producción y utilización de una inmensa variedad de sustancias químicas. Ello llevó a otro problema ambiental, el vinculado con la **contaminación ambiental**. Los efectos corrosivos del aire contaminado de las ciudades sobre las esculturas de mármol fueron ya advertidos desde el Siglo XVII por John Evelyn, pero fue Robert Angus Smith quien recién en 1852 demostró los efectos de la contaminación atmosférica sobre la vegetación en los

alrededores de Newcastle y Liverpool, acuñando el término de “lluvia ácida” en 1872. En el mismo período, 1824 y 1827, Josep Fourier y Claude Pouillet describieron que los gases de la atmósfera eran capaces de atrapar el calor entregado por la radiación solar y en 1896 Svante Arrhenius realizó la primera predicción de un hipotético calentamiento global causada por el aumento de los niveles de CO₂ en la atmósfera. Otros autores continuaron la idea, atribuyéndose al científico inglés John Henry Poynting haber utilizado por primera vez el término “efecto invernadero” en 1909.

La contaminación del aire asociado al desarrollo industrial causó el incremento de enfermedades respiratorias, e incluso la muerte en poblaciones urbanas. A principio del Siglo XX por la combinación de la contaminación del aire y de las condiciones climáticas (inversión térmica y niebla) que causaron problemas respiratorios a miles de personas y la muerte de 60 y 20 personas en el del Valle de Mosa en Bélgica (1930) y la ciudad de Donora en Estado Unidos (1948), respectivamente. Sin embargo, el caso más trágico ocurrió en Londres en 1952 debido a la contaminación del aire producto de la combustión del carbón combinado con la niebla (smog) que terminó prematuramente con la vida de 12000 personas. Producto de ello en 1956 Gran Bretaña aprobó la “Ley de Aire Limpio”.

A su vez, las precarias condiciones de trabajo y la introducción de nuevas sustancias químicas en la floreciente industria de inicios del Siglo XX trajeron aparejados problemas de contaminación que afectaron la salud humana. Tal fue el caso del envenenamiento con tetraetilo de plomo que en 1924 afectó a 49, y mató a 5, trabajadores de la empresa “Standar Oil” que trabajaban en la refinería de Nueva Jersey en EEUU apodada “Loony Gas Building” (edificio de la gasolina loca). En tal sentido, los trabajos de la médica estadounidense, Alice Hamilton, permitieron avances en el campo de la medicina ocupacional vinculado a sustancias peligrosas como el mercurio, el fósforo, el benceno y el radio. En resumen, durante la primera mitad del Siglo XX se generó conciencia e instituciones dirigidas a la conservación de los recursos naturales, la calidad del aire urbano, la higiene industrial y la seguridad de los alimentos. Sin embargo, no fue hasta la segunda mitad del Siglo XX que la contaminación del ambiente se convirtió en un problema que llamó la atención de la opinión pública.

El desarrollo industrial luego de la Primera Guerra Mundial y el desarrollo de la Segunda Guerra Mundial tuvo un costo elevado para el medioambiente. Para esa época, el **paradigma de la dilución**, la solución para la contaminación es la dilución, reinaba en el mundo con consecuencias nefastas. En el año 1955, el Dr. Hagino y sus colegas descubrieron que la enfermedad de “itaí-itaí” (nombre acuñado por el severo dolor que causa la enfermedad) observada en los campesinos que habitaban la cuenca del Río Jinzu en Japón desde 1946, era debida a la contaminación de los arrozales por cadmio, producto de la actividad minera de Kamioka, gestionada por la minera “Mitsui Mining and Smelting”. Unas 184 víctimas fueron reconocidas oficialmente por el gobierno de Japón. Contemporáneamente, en 1959 investigadores de la Universidad de Kumamoto, Japón, identificaron que la “Enfermedad de Minamata” detectada en 1956 en la población de la ciudad homónima, y relacionada con la “fiebre

de los gatos bailarines” observada desde principios de los 50, era producto del envenenamiento por metil-mercurio producto del consumo de pescado y mariscos provenientes de la Bahía de Minamata que había sido contaminada con mercurio por la empresa Chisso Corporation desde que en 1951 cambió la catálisis con manganeso por la de mercurio para la producir acetaldehído. En 2001, Japón reconoció 2265 víctimas, de las cuales 1784 han muerto. Otro caso emblemático de la contaminación ambiental, ha sido el Río Cuyahoga en Ohio, Estados Unidos, que producto de la contaminación industrial del agua con aceites y petróleo se incendió 13 veces desde 1868, siendo la de 1952, la más severa en cuanto a los daños, pero la de 1969 la que causó mayor reacción social por su publicación en el diario “Times”, estimulando la formación de movimientos ambientalistas que llevaron a la promulgación de la Ley de Agua Limpia, el Acuerdo sobre Calidad de las Aguas en los Grandes Lagos y la creación de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. Al año siguiente, 1970, otro importante caso de contaminación industrial estalló en Estados Unidos en el “Love Canal”, un vecindario de 28 ha próximo a las Cataratas del Niágara que en la década del 20 fue abandonado y se convirtió en un basurero municipal que 20 años después fue comprado por dos empresas, Hooker Chemical Company y Occidental Chemical Corporation, que lo utilizaron para descartar más de 20 mil toneladas de residuos peligrosos. Ello lo convirtió en la causa de un desastre masivo de contaminación ambiental que dañó la salud de cientos de residentes y que culminó en una extensa operación de limpieza que en 1980 dio origen a la ley “CERCLA” (Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act) o “Superfund” sobre la limpieza de sitios contaminados. Todos estos casos de contaminación hicieron que gradualmente se fuera cambiando del paradigma de la dilución al **paradigma del boomerang**, que sostiene que todo lo que se tira al ambiente termina volviendo para dañarnos.

La revolución verde, surgida a inicio de la década del 40, promovió la incorporación de pesticidas y fertilizantes para incrementar la producción agrícola, pero no siendo inocua para el ambiente. En tal sentido, quizá el caso más resonante, y que generó por primera vez preocupación pública por el efecto de los contaminantes sobre especies no humanas, estuvo vinculado al uso del DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), un insecticida que comenzó a utilizarse durante la década de los 40 y cuyos efectos deletéreos sobre la biota fueron evidenciados recién 20 años después. En 1954 en el estado de Michigan se evidenciaron mortandades de petirrojos luego de las aplicaciones de DDT, que se utilizaba para combatir la enfermedad del olmo holandés. Luego, entre 1957 y 1960 se detectaron mortandades del achichilique occidental por acumulación de DDD (dicloro-difenil-dicloroetano), insecticida de la familia del DDT utilizado para combatir el mosquito del Lago Claro. Sin embargo, estos estudios no tomaron relevancia en la opinión pública hasta que en 1962 fueron compilados y publicados por la periodista estadounidense Rachel Carson en su libro “Silent Spring”. Por su resonancia en la opinión pública este trabajo suele ser considerado un hito vinculado al surgimiento de la **ecotoxicología**.

Definiciones y peculiaridades de la disciplina

La primera definición del término “**ecotoxicología**” suele ser atribuida al toxicólogo francés René Truhaut, quien en junio de 1969 la definió, durante una reunión del “International Council of Scientific Unions” (ICSU) en Estocolmo, como *“la rama de la toxicología relacionada con el estudio de los efectos tóxicos, causados por contaminantes naturales o sintéticos, a los componentes de los ecosistemas, animales (incluidos los humanos), vegetales y microbianos, en un contexto integral”*. Esta definición se caracteriza por considerar a la ecotoxicología como una rama de la toxicología y por enfocarse en los efectos tóxicos de los contaminantes sobre el componente biótico del ecosistema, incluyendo a los seres humanos como blancos de tales efectos. La definición no contemplaría otros efectos adversos que el ser humano causa sobre los ecosistemas, tales como la deforestación, la sobreexplotación, la introducción de especie exóticas, escaparían del alcance de dicha definición.

Muchas otras definiciones fueron dadas posteriormente. Quizá, las que introducen variantes más marcadas respecto a la definición de Truhaut, sean la de Suter (1993) quien excluye a los seres humanos de la definición, o la de Shane (1994) y Forbes & Forbes (1994) que remarcan en la definición la inclusión del estudio de la distribución y destino ambiental de los contaminantes. Hoffman y col. (1995) mencionan explícitamente el concepto de “especies no blanco” en su definición.

Es importante remarcar que muchas veces el término ecotoxicología se utiliza como sinónimo de “**toxicología ambiental**” cuando es concebido en el contexto de la definición dada por Landis & Yu (1995), como *“el estudio del impacto de los contaminantes sobre la estructura y función de los sistemas ecológicos (desde las moléculas a los ecosistemas)”*. Sin embargo, para otros autores como Walker (2014) la toxicología ambiental sería una disciplina más amplia, ya que abordaría, por un lado, a la ecotoxicología (efecto de los tóxicos sobre el ecosistema), y por otro, a los efectos de los contaminantes sobre la salud humana.

En el presente libro se utilizará el término ecotoxicología como una *“disciplina científica aplicada que tiene por objeto comprender y predecir la distribución, destino y efectos, directos e indirectos, causados por agentes contaminantes de naturaleza física, química (de origen natural o sintético) o biológica que, producto de la acción antrópica, alcanzan en el ambiente niveles anormales alterando la estructura y/o función de los ecosistemas, con el fin de proveer herramientas de gestión que permitan prevenir, mitigar o remediar tales efectos”*.

En esta definición hace hincapié primero en incluir el estudio de la distribución y destino del contaminante, en particular referido a la biodisponibilidad, dado que ello condicionará significativamente la fase de exposición. Es importante remarcar que la ecotoxicología, según esta definición, intenta comprender los efectos indirectos causados por los contaminantes. Ello es de relevancia porque como se verá más adelante, los contaminantes suelen actuar a nivel molecular y luego generar una cascada de efectos que pueden terminar teniendo efectos a niveles de organización superiores como el de comunidad. A este nivel, por lo general el efecto del contaminante no es directo, sino que actúa indirectamente, por ejemplo, causando la pérdida de una especie

clave del ecosistema que modifica las relaciones tróficas en la comunidad, alterando a su vez los flujos de materia y energía en el ecosistema.

Además, en la definición dada, se trata de especificar qué se entiende por contaminante, aspecto que no siempre ha sido definido claramente. Aquí se entiende por contaminante a cualquier agente físico, químico (de origen natural o sintético) o biológico pero introducido por el hombre en el ambiente a niveles anormales. Puede tratarse de un efluente a alta temperatura, niveles de iluminación nocturna altos o sombras inadecuadas, ruidos elevados, bacterias o virus presentes en residuos patogénicos, niveles de metales, nutrientes u hormona naturales (ej. estradiol) anormales. Otro aspecto a destacar es que, en la definición se enfatiza que los agentes contaminantes deben ser introducidos al ambiente por actividades propias del ser humano. Esto quiere decir que se excluyen fenómenos naturales como erupciones volcánicas, dado que se tales fenómenos son considerados naturales, independientemente que puedan generar un perjuicio para el ser humano o un ecosistema dado. Su estudio no deja de ser relevante o interesante, pero es improbable que dos fenómenos se repitan del mismo modo o que puedan ser regulados por el ser humano y por tanto ello escaparía a la naturaleza de los problemas que ha dado históricamente origen a la ecotoxicología.

Aquí resulta oportuno hacer una distinción entre dos términos de la literatura anglosajona que en español suelen utilizarse bajo la misma denominación de contaminante. En inglés, se hace una diferenciación clara entre el término “**contaminant**” y “**pollutant**”. El primer término se aplica un agente (químico, físico o biológico) que se encuentre en el ambiente a niveles anormales respecto a un nivel de base, pero sin que ello implique este genere un daño sobre el ecosistema. En el caso de “pollutant”, se trata de un contaminante para el cual existe evidencia concreta a cerca de su efecto dañino sobre el ecosistema. Desafortunadamente en español el término “poluente” no existe en el diccionario de la lengua y por tanto suele utilizarse el término contaminante con ambas acepciones.

En coincidencia con la definición de Suter (1993), se excluye de la definición dada a los efectos que los contaminantes puedan tener sobre el ser humano, debido a que se considera dicho aspecto más afín a la toxicología, y que, en la práctica suele ser incumbencia de los médicos o los bioquímicos más que de los ecotoxicólogos, que no se encuentran habilitados profesionalmente para trabajar con muestras humanas.

Finalmente se resalta el carácter práctico de la disciplina en cuanto a que el conocimiento generado busca en última instancia ser aplicado a la resolución de problemas concretos, en cierto modo, asemejándose así a la medicina humana o veterinaria, pero aplicada al ecosistema. En tal sentido, la ecotoxicología adquiriría una característica propia de las ciencias ambientales que, según la definición brindada por Cunningham & Cunningham (2010), a diferencia de las disciplinas más teóricas, están orientadas a la misión. Es decir, busca generar un conocimiento nuevo, válido y contextual sobre el mundo natural y nuestros impactos en él, pero *al obtener tal información crea la responsabilidad de involucrarse en tratar de hacer algo sobre los problemas que hemos encontrado.*

Una peculiaridad de la ecotoxicología, es que se trata de una **disciplina sintética**, ello quiere decir que toma conocimientos de muchas otras disciplinas tanto desde las ciencias exactas y de la tierra (química, geoquímica. Hidrología, geología, etc.) como de las ciencias de la vida (biología, ecología, toxicología, bioquímica, etc.). Muchas de las herramientas y conocimientos utilizados, tales como las dosis respuestas o los bioensayos de toxicidad, han sido heredados de la toxicología. Otros, vinculados a la distribución y destino de los contaminantes han sido tomados de la química y así se podrían mencionar numerosos ejemplos.

Otra particularidad, es que es una disciplina que debe integrar diferentes **niveles de organización jerárquica**, desde el nivel molecular hasta el nivel de ecosistema o más aún el de biósfera ([Figura 1.1.](#)). Ello conlleva el problema que cada nivel posee sus propias propiedades emergentes, características que son únicas de ese nivel y que no se pueden evaluar ni en los niveles inferiores o superiores. Por ejemplo, el nivel molecular es definido por la relación entre diferentes átomos que conforman la molécula, y por tanto un enlace químico, será propiedad emergente de dicho nivel, y no será hallado ni a nivel atómico, ni a nivel de las organelas. Lo mismo ocurre con el nivel de comunidad, conjunto de especies que conforman un ecosistema, donde las propiedades emergentes estarán vinculadas a las relaciones entre especies (ej. relación predador presa, riqueza específica, biodiversidad) que no podrán ser evaluadas a nivel de una población o de un ecosistema. Este carácter aparentemente “estanco” entre niveles de organización, ha dificultado encontrar vasos comunicantes entre el efecto de un contaminante que generalmente se inicia a nivel molecular y luego se propaga como modificaciones a nivel de la población, de la comunidad o del ecosistema, incluso muchas veces como efectos indirectos y difíciles de asociar claramente con el tóxico. Además, la dinámica propia de cada nivel hace que las respuestas frente a un contaminante sean relativamente rápidas y específicas a nivel molecular haciendo más fácil el establecimiento de las relaciones entre las causas y los efectos y pudiendo ser utilizadas de forma proactiva (predecir efectos adversos antes que sean irreversibles). Sin embargo, a ese nivel no se sencillo predecir fácilmente cuáles serán los efectos del contaminante a niveles ecológicos. Contrariamente, los estudios a niveles de poblaciones, comunidades o ecosistemas, poseen importancia en cuanto a detectar efectos de relevancia ecológica, pero suelen ser reactivos (los efectos se detectan cuando el daño ocurrió y a veces ya es irreversible), exige de tiempos largos de observación y resulta complejo establecer las relaciones causa efecto. Ello requiere, a su vez, de diferentes herramientas ecotoxicológicas (ej. bioensayos) de diferentes niveles de complejidad. Como se verá más adelante en los últimos años, se ha intentado abordar esta problemática mediante estrategias metodológicas como las AOPs (Vías de Efectos Adversos).

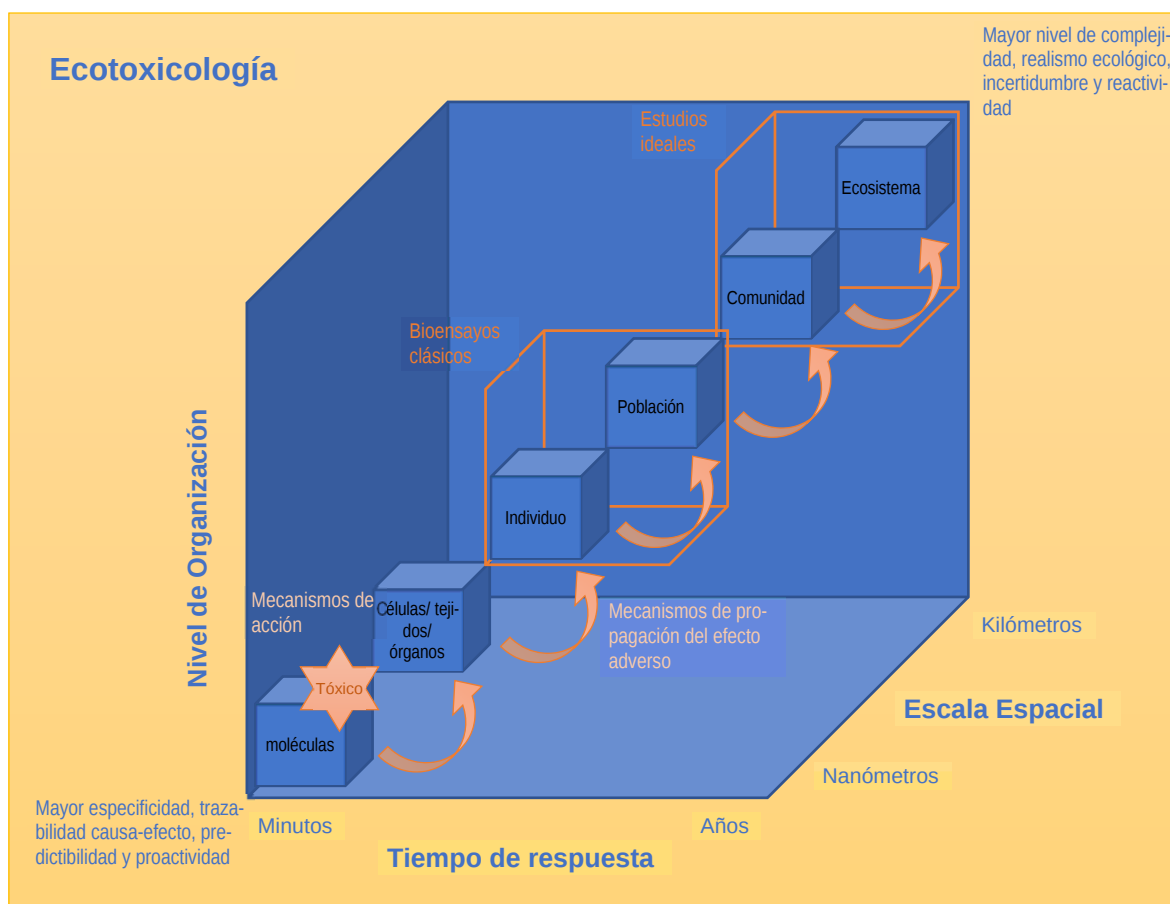


Figura 1.1: Complejidad de análisis de los niveles de organización jerárquicos en la ecotoxicología

Un aspecto muy interesante de la disciplina, planteado en su libro “Fundamentos de Ecotoxicología” por Prof. Michael Newman, es que pueden distinguirse en ella tres metas fundamentales, la meta científica, la tecnológica y la aplicada (Figura 1.2.). La **meta científica** tiene que ver con generar conocimiento básico sobre cómo los contaminantes inducen efectos adversos a los diferentes niveles de organización, estudiar los mecanismos de acción, las causas que explican la existencia de tolerancia individual o respuestas estocásticas, los factores que afectan la bioacumulación no la biomagnificación de los contaminantes, los vínculos entre los efectos sobre los organismos y la viabilidad de las poblaciones, etc. El alcance de esta meta suele ser universal y los tiempos de desarrollo del conocimiento suele ser relativamente prolongados. La **meta tecnológica** se encuentra vinculada a la aplicación de los conocimientos básico en el desarrollo de herramienta de evaluación, tales como bioensayos de toxicidad, nuevas pruebas “in vitro”, aplicación de las tecnologías ÓMICAS (transcriptómica, proteómica, metabolómica), desarrollo estrategias como las AOP’s o de procedimientos como las evaluaciones de riesgo ecológica (ERA). Esta meta suele tener un alcance un poco más acotado, dependiendo de las necesidades de cada país o región y los tiempos de elaboración suelen ser más acotados. Finalmente, las **metas prácticas**, están dirigidas a aplicar las herramientas desarrolladas para abordar problemas concretos en general a una escala más local y en tiempos más cortos. Así un municipio podrá utilizar los bioensayos

para evaluar la calidad de los efluentes que vuelcan sus industrias, o una agencia del estado utilizar la ERA para juzgar oportuna o no la aprobación de una determinada sustancia nueva para el mercado.

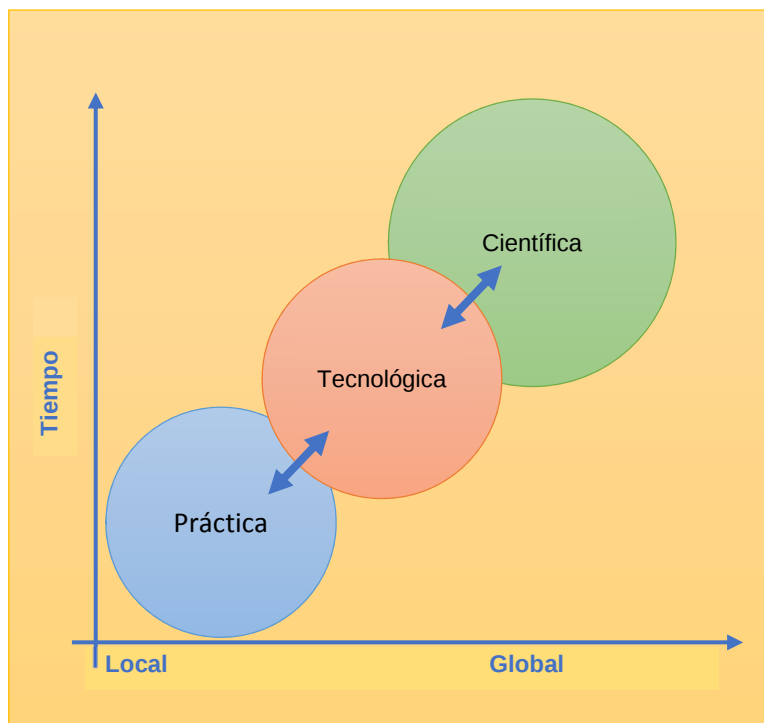


Figura 1.2: Metas de la ecotoxicología propuestas por el Prof. Michael Newman y su relación con la escala espacial y temporal

Contexto internacional en materia ambiental durante el desarrollo de la disciplina

A partir de la década del 70 en adelante la preocupación pública por las problemáticas medioambientales ha ido tomando cada vez mayor impulso forzando a los gobiernos a intervenir en el asunto mediante acciones concretas. El 22 de abril de 1970 se realizó en Estados Unidos una manifestación multitudinaria en reclamo de mayor concientización ambiental, promovida por el Senador y activista norteamericano Gaylord Nelson, que contribuyó a la creación de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y una serie de leyes destinadas a la protección del medio ambiente, conmemorándose luego en el “Día Internacional de la Madre Tierra”. Luego, entre el 5 y 16 de junio de 1972, se llevó a cabo en Suecia la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente Humano, mejor conocida como “Conferencia de Estocolmo”, que fue la primera gran conferencia de estados del mundo que se organizó sobre cuestiones medioambientales. La conferencia condujo al establecimiento de muchas agencias nacionales de protección ambiental y al Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). En el mismo año, el Club de Roma publicó los límites del crecimiento, prediciendo el colapso de la civilización debido al crecimiento de la población y la disminución de los recursos naturales. En 1985 se elaboró el

Convenio de Viena para la protección de la capa de ozono que entró en vigor en 1988, y que, en 1989 dio lugar al Protocolo de Montreal, diseñado para proteger la capa de ozono reduciendo la producción y el consumo de sustancias que reaccionan con ella y eran responsables del agotamiento de la misma. Contemporáneamente, la Comisión Brundtland de la ONU elaborará en 1987 un informe sobre problemas ambientales y de desarrollo críticos en todo el mundo, definiendo el **desarrollo sostenible** como "desarrollo que satisface las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades". En 1989 se adopta el Convenio de Basilea, un Acuerdo Multilateral entre 170 países dentro del sistema de Naciones Unidas sobre que convinieron proteger el medio ambiente y la salud humana de los efectos nocivos provocados por la generación, manejo, movimientos transfronterizos y eliminación de desechos peligrosos. Más tarde, en 1992 casi doscientos gobiernos participaron en la Cumbre de la Tierra de Río, Brasil, dando como resultado un acuerdo en la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. Seguido, en 1997 se firmará el Protocolo de Kioto, un protocolo de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC) y acuerdo internacional que tiene por objetivo reducir las emisiones de seis gases de efecto invernadero, responsables del calentamiento global. El mismo fue adoptado por los Estados Unidos y otras 121 naciones, pero no ratificado por el Congreso de los Estados Unidos porque la industria estadounidense predijo un "desastre económico" si se aplicaban las reducciones de emisiones de CO₂. En 2000 se establecieron los "Objetivos de Desarrollo del Milenio" que fueron lanzados por la ONU para ser alcanzados en 2015. En 2015 se firma el Acuerdo Climático de París que estableció un objetivo a nivel mundial para limitar el calentamiento global a menos de 2 °C. Sin embargo, en 2017 se anuncia la retirada de los Estados Unidos del Acuerdo de París. Afortunadamente, los otros diecinueve miembros del G20 reafirmaron su compromiso. En 2018 se firma el primer acuerdo regional en asuntos ambientales de América Latina y el Caribe (Acuerdo de Escazú), que trata sobre el acceso a la información, la participación pública y el acceso a la justicia en asuntos ambientales en América Latina y el Caribe. Toda esta serie de acuerdos y protocolos internacionales demuestran un cambio de conciencia a nivel internacional respecto a la importancia que los problemas ambientales tienen en relación al bienestar y viabilidad de las generaciones presentes y futuras.

Evolución de la disciplina alrededor del mundo desde su surgimiento

La evolución de la disciplina en el mundo desde su gestación a fines de la década del 60, cuando Truhaut le acuñó el nombre, a la actualidad puede observarse mediante un análisis rápido y no exhaustivo, utilizando la base de datos Scopus®, a analizar la primera vez que el término fue utilizado en el título, resumen o palabras clave de trabajos publicados en revistas internacionales indexadas ([Figura 1.3.](#)). Entre los países analizados, los primeros en adoptar el término fueron Japón, Canadá, Estados Unidos y Alemania, que lo hicieron tempranamente

durante la década del 70. Luego, se distingue otro grupo de países en los que la comunidad científica adoptó el término durante la década del 80, como el caso del Reino Unido, España, India, Australia y Argentina, primer país Latinoamericano en utilizar el término en una publicación. Otros países, como México, Brasil y China, recién lo emplearon en la década del 90. En el caso de China quizá explicado por su apertura más tardía a la cultura occidental. Finalmente, algunos países utilizaron la palabra ecotoxicología más tardíamente, recién luego de comenzado el Siglo XXI. Entre ellos cabe destacar a Uruguay, Ecuador y Paraguay. Salvo para la Argentina, en el que la disciplina se inició antes, en los demás países latinoamericanos pareciera que la Cumbre de Río, celebrada en 1992, hubiera tenido importancia sobre la instalación de la disciplina como tal.

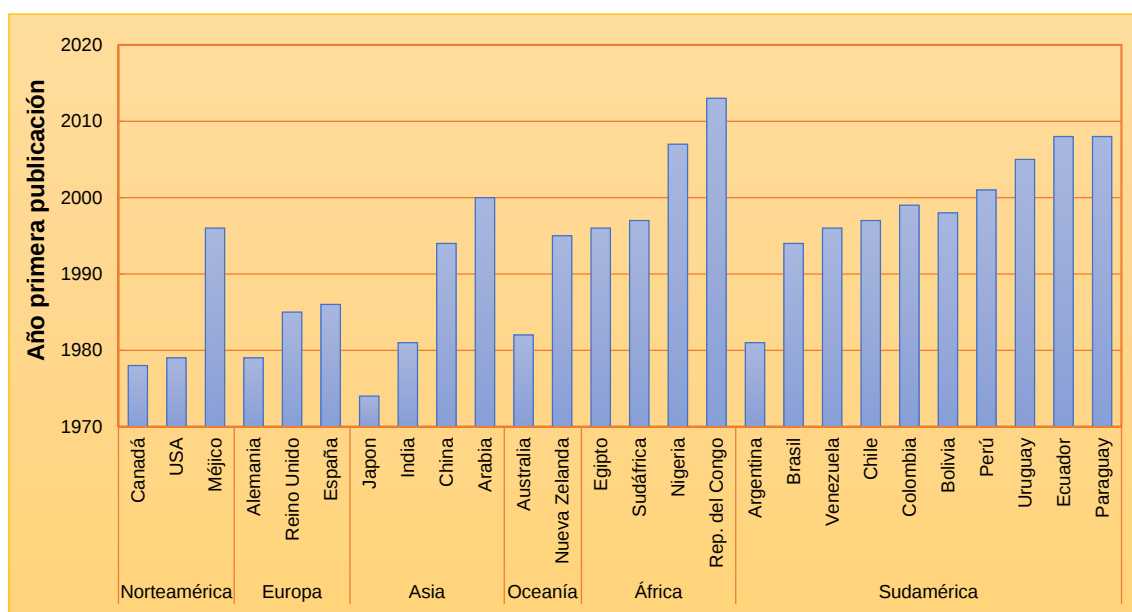


Figura 1.3: Comparación del momento de aparición del uso del término ecotoxicología en las publicaciones científicas (título, resumen, palabras claves) en países de diferentes regiones del mundo. Fuente Scopus®

Otro análisis interesante es el que se obtiene de comparar, para los diferentes países analizados, el número total de publicaciones, utilizando la palabra en el título, resumen y palabras claves, desde la primera publicación hasta 2019 (Figura 1.4.). Puede observarse un grupo de países que ha generado más de 1000 trabajos en la temática, encabezado por Estados Unidos y seguido por China, los países europeos y Brasil. Es interesante destacar el rápido crecimiento en la materia de China y Brasil, en particular considerando su inicio relativamente tardío. En algunos países africanos y sudamericanos el desarrollo de la disciplina se observa aún muy postergado, mostrando oportunidades para generar interacciones con los países con mayor grado de avance de forma de acelerar el desarrollo de la misma.

Por consiguiente, puede observarse que la evolución de la disciplina alrededor del mundo ha sido de forma bastante despareja, habiendo avanzado en los países con economía más fuertes y ha quedado más relegada en países con problemáticas socio-económicas básicas aún no resueltas. En Latinoamérica, Brasil, Argentina y Chile, muestran un mayor nivel de avance a nivel

científico, pero aún la aplicación práctica de la disciplina a nivel de la legislación y la gestión se encuentra muy relegada en comparación a los países de Nortea América y Europa. Ello es aún más marcado a nivel de la integración internacional donde ya deberían existir criterios de calidad ambiental y herramientas de evaluación, con fundamentos ecotoxicológicos, comunes entre los países de la región.

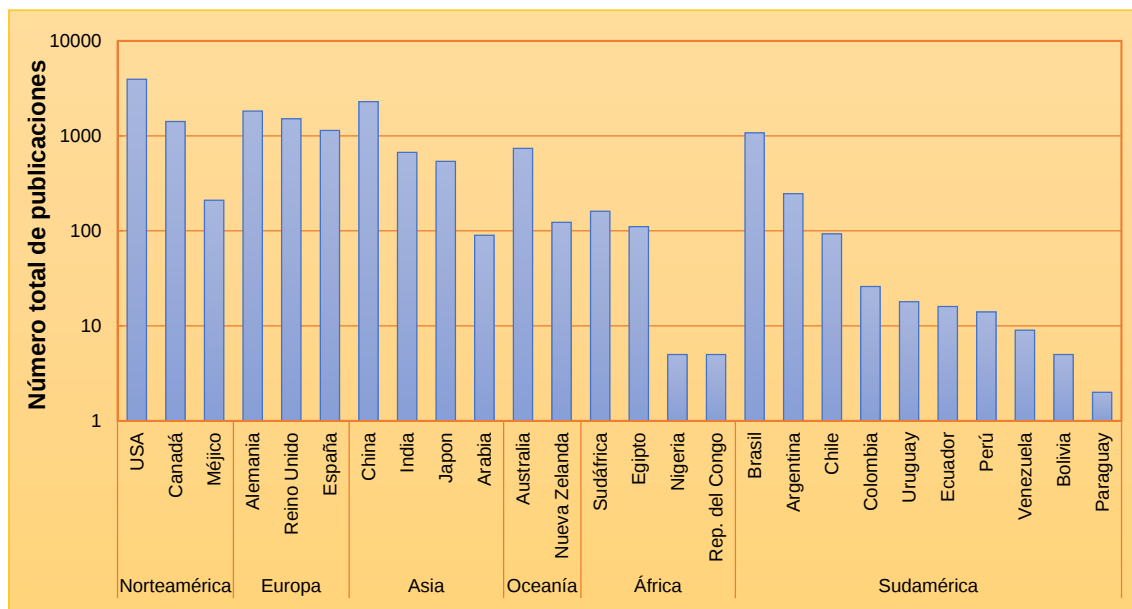


Figura 1.4: Comparación de la cantidad de publicaciones científicas conteniendo la palabra ecotoxicología (título, resumen o palabras claves) en países de diferentes regiones del mundo hasta 2019. Fuente: Scopus®

Necesidades actuales y perspectivas futuras

Para el estudiante recién iniciado resultará de valor comprender cual es el papel actual y las necesidades futuras de la disciplina. Han sido expuestos previamente los problemas pasados que han llevado a la necesidad del surgimiento de la ecotoxicología, los cambios de paradigma en materia ambiental que han ido ocurriendo en las últimas décadas y como se ha ido desarrollando la disciplina en diferentes países. Hacia adelante, se vislumbra que los problemas no sólo no han sido completamente resueltos, sino que, además cada día surgen problemas nuevos.

En el contexto de una sociedad tecno-industrial gobernada por una economía de consumo, puede decirse que la ecotoxicología es una disciplina necesaria para sopesar los costos y beneficios de las innumerables decisiones tecnológicas e industriales que afectan nuestras vidas. Más allá de los aspectos éticos, que deberían prevalecer desde una filosofía más “ecocéntrica”, incluso desde una visión “antropocéntrica” los servicios que brindan los sistemas naturales no deberían ser hoy visto como un “lujo” para la humanidad, sino “esenciales” para su subsistencia. Como se ha mencionado al inicio del capítulo, las actividades humanas han causado cambios sobre la superficie de la tierra tan significativos que en la década del 80 Eugene Stoermer acuñó el nombre de Antropoceno a una época geológica que comenzaría a finales del Siglo XVIII y que

estaría caracterizada por cambios a nivel de la biósfera inducidos por el ser humano sobre los ciclos del carbono (cambio climático), nitrógeno, fósforo y azufre (eutrofización) y del agua, además de estar causando la sexta extinción masiva en la historia de la tierra. El término ha sido luego adoptado por muchos otros autores, como el Premio Nobel Paul Crutzen. De hecho, autores como Rockström y colaboradores en 2009 establecieron valores límite para diferentes parámetros ecológicos y consideraron que muchos de ellos estaban excedidos, como el caso de la biodiversidad y el ciclo del nitrógeno. Michael Newman en su libro se pregunta si los contaminantes han pasado su valor límite, o si ya lo han sobrepasado y lo desconocemos.

De acuerdo con el “Chemical Abstract System” (CAS) hay 100 millones de sustancias registradas y alrededor de 4000 son incorporadas diariamente. De acuerdo al número de sustancias registradas y pre-registradas en el REACH (Registro, Evaluación y Autorización de Sustancias Químicas de la Unión Europea), existen entre 30 a 50 mil sustancias industriales utilizadas en productos de uso diario. Se han mostrado varios ejemplos en los que la introducción de sustancias en el ambiente ha causado problemas de contaminación en el pasado y cómo el paradigma de la dilución ha fracasado y actualmente resulta inaceptable por las consecuencias nefastas que ha tenido para la salud humana y la integridad de los ecosistemas dando paso al paradigma del boomerang. El hecho que el progreso tecno-industrial y la legislación ambiental evolucionen de manera desigual dentro y entre los países genera grandes posibilidades para la repetición de errores pasados.

En tal contexto, la ecotoxicología aparece como esencial para sopesar los costos y beneficios de las innumerables decisiones tecnológicas e industriales que afectan nuestras vidas. La ecotoxicología nos permite conocer el riesgo asociado a muchos de los contaminantes tradicionales (PCBs, Hg, DDT) que siguen estando entre nosotros y que varios, pese a haber sido prohibidos (ej. DDT), siguen siendo aún utilizados en algunos países del mundo.

Otra problemática, sobre la que deberá enfocarse, es la producción, transporte y consumo de petróleo. Está claro que sigue siendo un problema latente desde el punto de vista ambiental como ya se ha visto en el accidente ocurrido en la plataforma “Deepwater Horizon” en 2010 en el golfo de Méjico, el derrame del “Exxon Valdez” en 1989 en Alaska, o en relación a los riesgos asociados a las explotaciones no convencionales como las “oil sands” en Canadá o el “oil fracking” en la Patagonia argentina.

Los problemas ambientales asociados a la producción minera tampoco escapan de la necesidad de contar con la ecotoxicología. El caso de contaminación de varios ríos con cianuro por la Minera Barrick Gold en Veladero en San Juan en 2015, son un claro ejemplo de ello.

La tendencia creciente a la producción de energía a partir de plantas nucleares pondrá desafíos en cuanto a los problemas asociados a la reactividad, frente a posibles fugas como ocurrida en 2011 en la Central de Fukushima Daiichi, en Japón.

A 50 años del libro “Silent Spring” los riesgos de los plaguicidas asociados a la producción agrícola continúan siendo un desafío para la ecotoxicología. En países de Latinoamérica, como Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay, la expansión de la frontera agrícola y el incremento del consumo de plaguicidas asociado con el cultivo de soja transgénica es un ejemplo de ello.

El problema de contaminación urbano-industrial sigue siendo aún otro reto para la ecotoxicología. Ya se han mencionado en casos icónicos como el del “Love Canal” durante la década del 40 en Niagara, Estados Unidos. En Argentina, sitios como “Villa Inflamable” en la cuenca del Río Matanza/Riachuelo son un claro ejemplo de esta complejidad y desafío que quedan por delante.

Finalmente, la incorporación de nuevos productos químicos, “contaminantes emergentes”, al medioambiente se está convirtiendo en una preocupación creciente. Los retardantes de fuego bromados, los subproductos de cloración, los productos químicos fluorados, los estrógenos sintéticos, las hormonas de la producción ganadera, los etoxilatos de alquilfenol y sus productos de degradación, los productos desinfectantes, los productos farmacéuticos y los componentes de los productos para el cuidado personal son ejemplos importantes de contaminantes ignorados hasta ahora que se descargan actualmente en grandes cantidades. En tal sentido, la ecotoxicología aporta herramientas indispensables para la evaluación de la inocuidad ambiental de nuevas sustancias que ingresarán al mercado.

En términos más generales, aquellos contaminantes que pueden ser susceptibles de transporte atmosférico, como el caso de contaminantes orgánicos persistentes como los organoclorados, o que manifiesten efectos inesperados tales como la inducción de disrupción endócrina y desviación de la proporción de sexos en anfibios, asociada al herbicida atrazina, serán temas de relevancia para la ecotoxicología.

Desde el punto de vista de los desafíos para la propia disciplina, siguen siendo poder predecir con mayor precisión los efectos crónicos de los contaminantes que actúan a muy bajas concentraciones con el caso de los disruptores endocrinos, sustancias inmunosupresoras, neurotóxicas o genotóxicas. Identificar los múltiples efectos que pueden ser inducidos por un único contaminante o predecir los efectos inducidos por mezclas de sustancias y el efecto conjunto de múltiples factores de estrés (ej. contaminante y radiación, temperatura o patógenos). Poder dilucidar la complejidad de los efectos que ocurren a nivel de los ecosistemas dados por la diferencia de sensibilidad entre especies, determinar claramente la relación tóxico-efecto y entender como es la propagación de los efectos adversos de un nivel de organización biológica a otro (ej. individuo -> población -> comunidad). Se plantea, además, un desafío inicial que es evaluar dicha complejidad, en el contexto de un escenario cambiante debido al cambio climático.

Los futuros ecotoxicólogos contarán con nuevas herramientas mucho más potentes para evaluar tanto exposición como efectos. Los métodos de análisis químicos, con mejores niveles de detección y capacidad de identificación de sustancias en matrices complejas, como la espectrometría de masas, o en sistemas de monitoreo a gran escala como la que brindan los sensores satelitales. En cuanto a los efectos, las tecnologías ÓMICAs como la transcriptómica, proteómica o metabolómica, permite el análisis simultáneo en los cambios de miles de genes, proteínas o metabolitos en respuesta a un tóxico o mezcla de ellos. Muchas técnicas nuevas para trabajos a campo como identificación de especies por el ADN presente en el ambiente, uso de trampas cámara, satélites con sensores de alta resolución, drones, etc. Por otro lado, los modelos computacionales son cada vez más potentes y precisos y permiten procesar cada

vez mayores volúmenes de información. Todas estas herramientas permitirán trabajar a niveles de complejidad y escalas espaciales y temporales antes impensadas, anticipando un apasionante futuro para la disciplina.

Buenas prácticas en ecotoxicología

Como en cualquier otra disciplina científica, la capacidad predictiva dependerá de la calidad de la información obtenida para generar el conocimiento y los modelos para hacer la predicción. En tal sentido Catherine Harris y John Sumpter han realizado una gran contribución a la disciplina, proponiendo en 2015 una serie de principios básicos a considerar al momento de realizar cualquier trabajo experimental en el campo de la ecotoxicología. Los mismos son:

1. *La planificación adecuada y el buen diseño experimental son esenciales:* Si la planificación no se analiza adecuadamente, podría desperdiciarse un estudio completo.
2. *Definir la línea base:* Cuando se evalúa cualquier punto final, se debe establecer primero el nivel "normal" de ese punto final en un organismo no expuesto.
3. *Incluir controles apropiados:* Deben usarse controles de reactivos y controles positivos cuando sea posible/apropiado.
4. *Use rutas y concentraciones de exposición apropiadas:* Debe asegurarse que la ruta de exposición sea adecuada respecto al escenario que se desea evaluar (por ejemplo, a través del agua o de los alimentos) y que las concentraciones aplicadas se discutan dentro del contexto de las concentraciones halladas en el medio ambiente.
5. *Definir la exposición:* Es importante medir las concentraciones reales de la sustancia utilizada, de modo que se pueda describir el escenario de exposición real, en lugar de uno hipotético. Además, en los medios de exposición debería evaluarse la presencia de otros posibles contaminantes no deseados en el experimento.
6. *Comprende tus herramientas:* El conocimiento del organismo y la sustancia de prueba utilizada son vitales para generar resultados reproducibles.
7. *Piense en el análisis estadístico de los resultados al diseñar un experimento:* Es necesario considerar "a priori" cuidadosamente en el diseño experimental que modelo estadístico se utilizará posteriormente para su análisis, como así el número de concentraciones de exposición y el de organismos, de modo que los resultados tengan suficiente poder estadístico para dar una respuesta a la hipótesis que se está probando.
8. *Considere la dosis-respuesta:* Tratar siempre de describir la función tóxica mediante la curva dosis-respuesta o tiempo-respuesta construida con no menos de 5 niveles de tratamiento (concentraciones o tiempos de exposición). Cualquier patrón de respuesta "inusual" necesita más análisis y justificación.
9. *Repita el experimento:* Esto puede no ser necesario cuando los resultados son consistentes y el poder estadístico es fuerte. Sin embargo, en general, y particularmente cuando los

resultados son inesperados y/o ambiguos, se debe demostrar que los resultados obtenidos no han sido aleatorios y que por el contrario son reproducibles.

10. Considerar factores de confusión: Deben tenerse en cuenta factores como la temperatura, enfermedades y la exposición a otras múltiples sustancias; Estos pueden ser especialmente relevantes en el trabajo de campo.

11. Considere el peso de la evidencia: Los resultados deben compararse con estudios anteriores. Por ejemplo, ¿Se apoyan mutuamente el trabajo de campo y los estudios de laboratorio? ¿Los efectos se ajustan al mecanismo de acción conocido de las sustancias ensayadas? Considere la plausibilidad de los resultados.

12. Informe los hallazgos de manera imparcial: No extrapolar en exceso (por ejemplo, de in vitro a in vivo); ser consciente de las limitaciones del estudio; no exagere un resultado con muy poca importancia; informar hallazgos negativos (es decir, sin efecto) y positivos.

La consideración de los principios enumerados sin dudas redundará en una mejor calidad de la información, la confiabilidad del conocimiento y por tanto la capacidad de predicción de los modelos que se apliquen utilizándolos. Son principios que cualquier estudiante de ecotoxicología debería incorporar como base tanto para el diseño de su propio trabajo experimental como para el análisis crítico de trabajos realizados por sus colegas.

Bibliografía

- Beketov, M.A., Liess, M., 2012. Ecotoxicology and macroecology - Time for integration. *Environ. Pollut.* 162, 247-254.
- Carriquiriborde, P., Bainy, A.C.D., 2012. Environmental toxicology and chemistry in Latin America. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 931-934.
- Cunningham, W.P., Cunningham, M.A., 2010. Environmental science: a global concern (11th). The McGraw-Hill Companies, Inc, Boston, MA, USA.
- Davis, D.L., Bell, M.L., Fletcher, T., 2002. A Look Back at the London Smog of 1952 and the Half Century Since. *Environ. Health Perspect.* 110, A734-A735.
- Dulio, V., van Bavel, B., Brorström-Lundén, E., Harmsen, J., Hollender, J., Schlabach, M., Slobodnik, J., Thomas, K., Koschorreck, J., 2018. Emerging pollutants in the EU: 10 years of NORMAN in support of environmental policies and regulations. *Environmental Sciences Europe* 30, 5.
- Engen, R.I., Behra, R., Burkhardt-Holm, P., Escher, B.I., Schweigert, N., 2004. Challenges in Ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* 38, 58-64.
- Fairbrother, A., Muir, D., Solomon, K.R., Ankley, G.T., Rudd, M.A., Boxall, A.B.A., Apell, J.N., Armbrust, K.L., Blalock, B.J., Bowman, S.R., Campbell, L.M., Cobb, G.P., Connors, K.A., Dreier, D.A., Evans, M.S., Henry, C.J., Hoke, R.A., Houde, M., Klaine, S.J., Klaper, R.D., Kullik, S.A., Lanno, R.P., Meyer, C., Ottinger, M.A., Oziolor, E., Petersen, E.J., Poynton,

- H.C., Rice, P.J., Rodriguez-Fuentes, G., Samel, A., Shaw, J.R., Steevens, J.A., Verslycke, T.A., Vidal-Dorsch, D.E., Weir, S.M., Wilson, P., Brooks, B.W., 2019. Toward Sustainable Environmental Quality: Priority Research Questions for North America. *Environ. Toxicol. Chem.* 38, 1606-1624.
- Furley, T.H., Brodeur, J.C., Silva de Assis, H.C., Carriquiriborde, P., Chagas, K.R., Corrales, J., Denadai, M., Fuchs, J., Mascarenhas, R., Miglioranza, K., Miguez Caramés, D.M., Navas, J.M., Nugegoda, D., Planes, E., Rodriguez-Jorquera, I., Medina, M.O., Boxall, A.B.A., Rudd, M.A., Brooks, B.W., 2018. Towards Sustainable Environmental Quality: Priority Research Questions for Latin America. *Integrated Environmental Assessment and Management*, doi.org/10.1002/ieam.2023.
- Hannß Carl von Carlowitz *Sylvicultura Oeconomica* Hauswirthliche Nachricht und Naturmäßige Anweisung zur Wilden Baum-Zucht. Reprint of the 2. edition from 1732, Verlag Kessel, ISBN 978-3-941300-19-4.
- Hardy, K., Radini, A., Buckley, S., Sarig, R., Copeland, L., Gopher, A., Barkai, R., 2016. Dental calculus reveals potential respiratory irritants and ingestion of essential plant-based nutrients at Lower Palaeolithic Qesem Cave Israel. *Quaternary International* 398, 129-135.
- Harris, C.A., Scott, A.P., Johnson, A.C., Panter, G.H., Sheahan, D., Roberts, M., Sumpter, J.P., 2014. Principles of sound ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* 48, 3100-3111.
- Likens, G. E.; Bormann, F. H.; Johnson, N. M. (1972). "Acid rain". *Environment*. 14 (2): 33–40. doi:10.1080/00139157.1972.9933001
- Poynting, J. H. (1907). On Prof. Lowell's Method for Evaluating the Surface-temperatures of the Planets; with an Attempt to Represent the Effect of Day and Night on the Temperature of the Earth. *Philosophical Magazine*, 14(84), 749–760.
- Seinfeld, John H.; Pandis, Spyros N (1998). *Atmospheric Chemistry and Physics — From Air Pollution to Climate Change*. John Wiley and Sons, Inc. ISBN 978-0-471-17816-3
- Stewart, A.J., 2018. Ecotoxicology: It's time for a hard re-look. *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 9-10.
- Van den Brink, P.J., Boxall, A.B.A., Maltby, L., Brooks, B.W., Rudd, M.A., Backhaus, T., Spurgeon, D., Verougstraete, V., Ajao, C., Ankley, G.T., Apitz, S.E., Arnold, K., Brodin, T., Cañedo-Argüelles, M., Chapman, J., Corrales, J., Coutellec, M.A., Fernandes, T.F., Fick, J., Ford, A.T., Giménez Papiol, G., Groh, K.J., Hutchinson, T.H., Kruger, H., Kukkonen, J.V.K., Loutseti, S., Marshall, S., Muir, D., Ortiz-Santaliestra, M.E., Paul, K.B., Rico, A., Rodea-Palomaes, I., Römbke, J., Rydberg, T., Segner, H., Smit, M., van Gestel, C.A.M., Vighi, M., Werner, I., Zimmer, E.I., van Wensem, J., 2018. Toward sustainable environmental quality: Priority research questions for Europe. *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 2281-2295.
- Webb, D., Gagnon, M.M., Rose, T., 2008. Hepatic metabolism of contaminants in the terapontid fish, yellowtail trumpeter (*Amniataba caudavittata* Richardson). *Environ Toxicol* 23, 68-76.
- Werner, I., Hitzfeld, B., 2012. 50 Years of ecotoxicology since Silent Spring - A review. *GAIA* 21, 217-224.

PRIMERA PARTE

Los contaminantes en el ambiente y su acumulación en la biota

CAPÍTULO 2

Principales familias de contaminantes, distribución y destino ambiental

Karina S. B. Miglioranza

En el presente Capítulo se describen los principales contaminantes ambientales, incluyendo su naturaleza, comportamiento en sistemas ecológicos y cualidades subyacentes. Incluyen contaminantes químicos inorgánicos y orgánicos, radiaciones, nanopartículas y contaminación térmica.

Los contaminantes químicos se dividen en gran medida en orgánicos e inorgánicos. Los compuestos orgánicos se componen de cadenas o anillos de carbono y predominantemente de los elementos no metálicos de los grupos I, IV–VIIA de la Tabla Periódica Figura 2.1. Sin embargo, en algunos casos importantes, los metales se integran en biomoléculas como los citocromos y hemoglobina, o contaminantes como metilmercurio y organoestaño.

Principales familias de contaminantes

Químicos Inorgánicos

Los contaminantes inorgánicos son compuestos que pueden entrar al medio ambiente intencional o no intencionalmente. Algunos son aplicados en el ambiente, por ej., arseniato de sodio como plaguicida, pero otros son liberados por una amplia gama de actividades humanas como el plomo utilizado en baterías, plomería, aditivos de gas y combustibles. En el caso de los nitratos y nitritos ingresan en las aguas potables por la fertilización de campos agrícolas como así también por los procesos naturales del ciclo de nitrógeno en el suelo. En algunos casos, se convierten en un problema sólo si dichas actividades elevan sus concentraciones a niveles por encima del máximo permitido, tanto para consumo de agua potable como para la protección de la biota acuática.

La tabla periódica es una herramienta importante para enmarcar los diferentes contaminantes inorgánicos. (Figura 2.1.). Los elementos dentro de cada uno de sus 18 grupos tienen configuraciones orbitales externas similares, resultando en características químicas comunes desde el punto de vista ambiental y toxicológico. Los elementos de esta tabla se pueden dividir generalmente en metales, no metales o metaloides (semimetales).

Metales

Dentro de las características importantes de los metales, desde el punto de vista de medio ambiente, se pueden mencionar aquellas que influyen en el movimiento del metal entre fases o

Figura 2.1: Tabla periódica de los elementos. Los metales (cuadros verdes) forman la mayoría de los elementos. Los no metales (cuadros rosas) son menos numerosos que los metales, pero incluyen los principales elementos utilizados por los organismos. Los metaloides (cuadros amarillos) tienen propiedades intermedias entre metales y no metales.

Figura 2.1: Tabla periódica de los elementos. Los metales (cuadros verdes) forman la mayoría de los elementos. Los no metales (cuadros rosas) son menos numerosos que los metales, pero incluyen los principales elementos utilizados por los organismos. Los metaloides (cuadros amarillos) tienen propiedades intermedias entre metales y no metales.

Metales

El 75% de los elementos químicos son metales. Generalmente, tienen entre uno y tres electrones en la última órbita y, por lo tanto, tienden a ceder electrones para formar enlaces químicos. Por ello, son buenos conductores del calor y la electricidad, ya que emiten electrones fácilmente al calentarse. Sus propiedades más destacadas son la maleabilidad, la ductilidad y el brillo. La mayoría de los metales tiene origen mineral. Los minerales son sustancias que se encuentran en la naturaleza y suelen formar depósitos que tienen gran valor económico. Cuando es posible extraer un metal de un mineral, a este último se lo denomina mena. Los metales más abundantes que pueden hallarse en menas son: hierro, calcio, aluminio, magnesio, potasio, sodio, titanio y manganeso.

Dentro de las características importantes de los metales, desde el punto de vista de medio ambiente, se pueden mencionar aquellas que influyen en el movimiento del metal entre fases o

matrices ambientales e interaccionan con los componentes del medio ambiente, incluidos los toxicológicos. La más importante es el enlace químico determinado por el comportamiento externo de los electrones orbitales. Generalmente, los metales tienden a perder electrones cuando reaccionan con los no metales. Como ejemplo destacado, los metales son donantes de electrones en varias reacciones biológicas normales y actúan como cofactores dentro de las coenzimas (vitaminas). La medida en que un metal comparte sus electrones durante la unión varía.

Dado a que la mayoría de los metales en el medio ambiente no existen de manera prominente en estado elemental, desde el plano ecotoxicológico resultan más relevantes los efectos de compuestos metálicos, complejos e iones. Los procesos biológicos normales pueden verse afectados negativamente por la absorción de metales desde el medio ambiente. Es necesario conocer las características que influyen en los cambios de estados de oxidación, ionización e incorporación en forma orgánica de los metales, para poder abordar la temática de efectos ecotoxicológicos. Además, es relevante comprender el comportamiento ambiental incluyendo movimientos e interacciones posteriores de los metales.

Los metales y no metales se encuentran separados en la Tabla Periódica por una línea diagonal de elementos. Los elementos a la izquierda de esta diagonal son los metales, y los elementos a la derecha son los no metales. Los elementos que integran esta diagonal -boro, silicio, germanio, arsénico, antimonio, telurio, polonio y ástato- tienen propiedades tanto metálicas como no metálicas.

Los no metales son un grupo minoritario de elementos, incluyen a los gases nobles que, por definición, son inertes. Suelen formar enlaces iónicos con los metales, ganando electrones, o enlaces covalentes con otros no metales, compartiendo electrones que, a su vez, determina parcialmente cuán polares podrían ser estos enlaces. Generalmente, cuanto mayor es la diferencia en electronegatividad entre dos elementos que interactúan, mayor tendencia hacia la formación de enlace iónico que covalente. Los no metales forman la mayor parte de la tierra, especialmente las capas más externas, y los organismos están compuestos en su mayor parte por no metales.

Los metaloides, los elementos restantes en la tabla periódica, son intermedios en sus propiedades, teniendo algunas cualidades de metales. Por ejemplo, pueden ser muy buenos semiconductores eléctricos con el aumento de la temperatura. También pueden formar fuertes enlaces covalentes con otros elementos.

Con el objeto de comprender los efectos de los metales y no metales en el ambiente, el enfoque ampliamente utilizado y más relevante es considerar sus tendencias de unión. De esta manera se aplica la teoría “Hard Soft Acid Base”, de sus siglas en inglés (HSAB) para clasificar metales y las fracciones químicas con los que interactúan.

La estabilidad de los enlaces entre metales disueltos en agua dulce y agua de mar está en relación a los ligandos que se unen. Los ligandos blandos corresponden a aquellas especies que son grandes, tienen estado de oxidación o carga pequeña, y son fuertemente polarizables, mientras que los ligandos duros, son pequeños, con carga grande y débilmente polarizables. Los ligandos blandos relevantes en los ambientes acuáticos son Cl^- , S_2^{2-} y HS^- . Por su parte, los ligandos duros relevantes que tienden hacia un estado duro incluyen los aniones disueltos, CO_3^{2-} y OH^- .

en aguas naturales y grupos orgánicos carboxilo y fenólicos en biomoléculas. Ejemplos de ligandos duros relevantes en aguas naturales incluyen F^- , SO_4^{2-} y NH_3 , mientras que ejemplos en biomoléculas son grupos fosfato en ADN o ARN, y grupos carboxilato ($R-COOH$).

Descripción y fuentes de metales y metaloides ambientalmente importantes

Aluminio. Es un metal naturalmente abundante en el medio ambiente que, en condiciones de pH bajo, como los que resultan de la precipitación ácida o el drenaje de minas, las concentraciones disueltas pueden aumentar en gran medida hasta valores que pueden causar la muerte de especies acuáticas.

Arsénico. Es un metaloide que junto a sus compuestos se utilizan en numerosos productos, incluyendo aleaciones metálicas, plaguicidas (ej., $Pb_3(AsO_4)_2$), conservantes para madera (cobre cromado preservación de arseniato), desecantes de plantas y herbicidas (ej., $Na_3As_3O_3$). Está asociado con las cenizas de carbón y también se libera durante la extracción de oro y plomo. A menudo está presente como un oxianión, por ejemplo, AsO_4^{3-} , $HAsO_4^{2-}$ y $H_2AsO_4^-$. Es tóxico y cancerígeno.

Cadmio Este metal se utiliza en la producción de aleaciones, galvanoplastia y galvanizado. También se usa en pigmentos, baterías, plásticos y una gran variedad de otros productos. Se genera durante procesamiento de mineral de zinc. Es tóxico y cancerígeno.

Cromo. El cromo se usa en aleaciones, catalizadores, pigmentos y conservantes de madera. También es utilizado en teñidos y como anticorrosivo. Puede estar presente como cromo hexavalente Cr (VI) o trivalente Cr (III).. Cr (VI) es cancerígeno y es la forma más tóxica. El cromo se lo encuentra como un oxianión, por ejemplo, CrO_4^{2-} , $HCrO_4^-$ y CrO_7^{2-} .

Cobre. El cobre se usa ampliamente para cableados, electrónica y plomería. También se utiliza para controlar el crecimiento de algas, bacterias y hongos. Es un elemento esencial, pero es tóxico en altas concentraciones.

Plomo. Este metal es tóxico y ubicuo debido a su uso generalizado en combustibles, baterías, soldaduras, pigmentos, tuberías, municiones, pinturas, cerámicas, y otras aplicaciones. El uso de compuestos antidetonantes que contienen plomo en las naftas se suspendió en una gran cantidad de países. Se utilizó hasta principios de la década del 80' para soldar latas, pero su uso ha sido prohibido, debido a evidencias sobre los efectos en la salud. Dentro de los efectos, causa anemia y disfunción neurológica con exposición crónica. Hay evidencias de envenenamiento de aves, causado por ingestión de plomo o plomadas.

Mercurio. Usado en electrónica, amalgamas dentales, producción de cloro-álcali, extracción de oro y pinturas. Es muy buen catalizador industrial y, debido a que es líquido a temperatura ambiente, también es buen componente en la electrólisis. Fue utilizado ampliamente como biocida, para prevenir el crecimiento de hongos, involucrando tratamientos de semillas y en numerosas industrias como las plantas de celulosa. La quema de combustibles fósiles, especialmente carbón es una fuente importante de mercurio en todo el mundo. Es un metal altamente tóxico, se acumulan a altas concentraciones en la biota, principalmente en la forma organometálica.

Níquel. Este metal se utiliza en aleaciones como el acero inoxidable y niquelado. También en la producción de baterías (baterías de Ni-Cd). A altas concentraciones, el níquel es tóxico y cancerígeno.

Metales de tierras raras. Los elementos de tierras raras han surgido como metales importantes a considerar en ecotoxicología. Son componentes esenciales de las pantallas de televisión, pantallas de computadoras y teléfonos celulares, redes ópticas, pulido de vidrio sistemas y tecnologías de imanes.

Selenio. Es un no metal que puede comportarse de manera similar al arsénico. Se utiliza en la producción de electrónica, vidrio, pigmentos, aleaciones y otros materiales. Es un subproducto del oro, minería de cobre y níquel. También se asocia con cenizas volátiles de carbón.

Zinc. Este metal esencial se usa ampliamente en recubrimientos protectores y galvanizado para prevenir la corrosión, y en aleaciones. Es menos tóxico que la mayoría de los metales previamente mencionados.

Tributilestaño (TBT). Se usó principalmente como pintura antiincrustante en los cascos de barcos y embarcaciones hasta su prohibición por la " Organización Marítima Internacional (OMI) sobre el control de sistemas antiincrustantes nocivos en buques". A bajas concentraciones, puede causar daños a las poblaciones de moluscos, resultando en anomalías de la concha y modificación de las características sexuales de los caracoles y afecta a la respuesta inmunitaria, neurotóxica y genética de otras especies marinas. Los compuestos organoestánicos como el trimetiltilin (TMT) y el trietiltilin (TET) son neurotóxicos.

Organoplomo. Los compuestos orgánicos de plomo como el tetra-alkil plomo se han utilizado ampliamente como aditivos antidetonantes a las naftas en altas concentraciones, siendo uno de los más comunes el tetra-etil plomo. El tri-alkil plomo producido a través del metabolismo hepático a partir del tetra alkil plomo puede causar disfunción neurológica.

Compuestos Organomercuriales. El metilmercurio y otros compuestos organomercuriales se usan o producen como consecuencia de procesos industriales y microbianos. Actúan como biocidas en recubrimientos de semillas. El metilmercurio se ha encontrado acumulado en varias especies de peces consumidas por los humanos. Estos compuestos causan daño neurológico y cardiovascular.

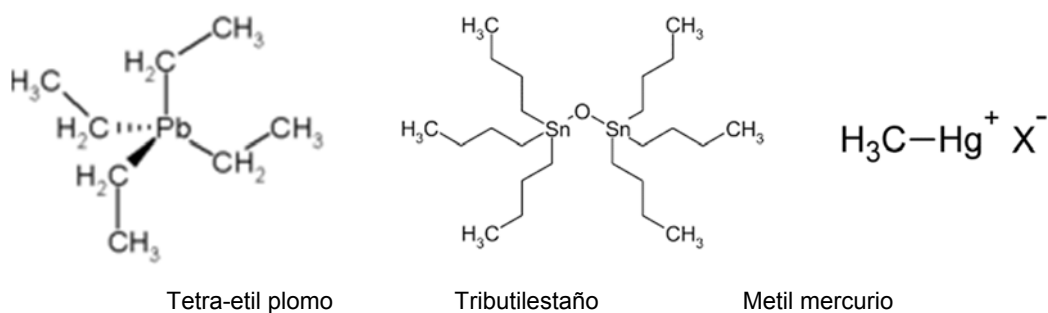


Figura 2.2: Ejemplos de compuestos organometálicos de relevancia ambiental.

Gases inorgánicos

El dióxido de carbono (CO_2) producto de la combustión, constituye una preocupación ambiental debido al aumento lentamente de las concentraciones en la atmósfera, las cuales están vinculadas a los cambios climáticos mundiales, tales como el calentamiento global.

Una consecuencia del aumento del CO_2 atmosférico y otros gases incluye la reducción en la cobertura de hielo polar. Los óxidos de nitrógeno (NO_x) y dióxido de azufre (SO_2) se producen en grandes volúmenes por combustión en instalaciones fijas (ej, centrales eléctricas de carbón) y fuentes móviles (ej., vehículos de motor). El NO_x y el SO_2 reaccionan en la atmósfera formando ácidos, y generando precipitaciones con pH bajo, proceso conocido como lluvia ácida. Existe evidencia epidemiológica de efectos adversos en la salud por estos gases, como la vinculación a diversas enfermedades pulmonares y cardiovasculares humanas, e incluso la muerte. Los altos niveles de SO_2 pueden causar necrosis de las hojas de las plantas.

Químicos Orgánicos

Dentro de los contaminantes orgánicos se incluyen compuestos que son liberados al ambiente intencionalmente como plaguicidas (insecticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas) y conservantes de madera. También forman parte de los contaminantes orgánicos aquellos que ingresan al ambiente de manera no intencional, tales como diversos subproductos industriales, detergentes, solventes, productos para el cuidado personal o productos farmacéuticos a través de efluentes (ej. antidepresivos, antibióticos y sustancias anticonceptivas).

Hidrocarburos lineales y policíclicos

Los hidrocarburos son compuestos químicos constituidos principalmente por átomos de carbono e hidrógeno. Pueden contener otros elementos en menor proporción como son oxígeno, nitrógeno, azufre, halógenos (cloro, bromo, yodo y flúor), fósforo, entre otros. Su estado físico, en condiciones ambientales, puede ser en forma de gas, líquido o sólido, de acuerdo al número de átomos de carbono y otros elementos que posean.

Según la naturaleza de sus enlaces se pueden clasificar en: hidrocarburos de cadena abierta (alifáticos) o cerrados (cíclicos y aromáticos). Dentro de los hidrocarburos de cadena abierta encontramos: hidrocarburos saturados e insaturados. Por su parte, en los hidrocarburos de cadena cerrada se encuentran los alicíclicos, (cicloalcanos, cicloalquenos, y cicloalquinos) y los aromáticos.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son un grupo de más de 100 sustancias químicas diferentes, que poseen al menos un anillo aromático dentro de su estructura. Se forman durante la combustión incompleta del carbón, petróleo y gasolina, basuras y otras sustancias orgánicas como tabaco y carne asada. Los HAPs se encuentran generalmente como una mezcla de dos o más de estos compuestos, tal como el hollín. Los HAPs se encuentran en alquitrán, petróleo crudo y creosota, aunque unos pocos se usan en medicamentos o para fabricar tinturas y plaguicidas. Los incendios forestales o de pastizales también liberan HAPs. Otros compuestos

dentro de este grupo, son los llamados HAPs petrogénicos, se originan de diversas fuentes petroquímicas como los derrames de petróleo. Se forman lentamente a baja temperatura durante la petrogénesis y a menudo contienen grupos alquilo, es decir, con agregado de grupos alcano. Los HAPs son una clase de contaminantes que persisten en suelos, sedimentos y material particulado suspendido en el aire. Son contaminantes ubicuos, derivados de la utilización del petróleo y del carbón, y sus consecuencias en el ambiente son nocivas, ya que tienen propiedades tóxicas, mutagénicas o cancerígenas, por ej: naftaleno, fenantreno, antraceno y benzopireno. Los HAPs con 4 o 5 anillos son más resistentes a la biodegradación que aquellos constituidos por 2 o 3 anillos. Su efecto cancerígeno y liposolubilidad implican que estas sustancias representan un riesgo para la salud humana y para el equilibrio ecológico.

Los HAPs biogénicos son también producido naturalmente por plantas, hongos y bacterias (Albers, 2003). Los patrones de abundancia característicos de los diversos HAP encontrados en muestras ambientales, se usan con frecuencia para inferir las contribuciones relativas de las fuentes de combustión y petróleo a cualquier contaminación.

De una manera general, los HAPs de bajo peso molecular tienden a ser más tóxico que los de mayor peso molecular (Kennish, 1997) y tienden a moverse fácilmente en el aire, mientras que los HAPs más grandes se asocian con los sólidos (Bunce, 1991). Los HAPs más grandes tienden a ser más cancerígeno que los más pequeños.

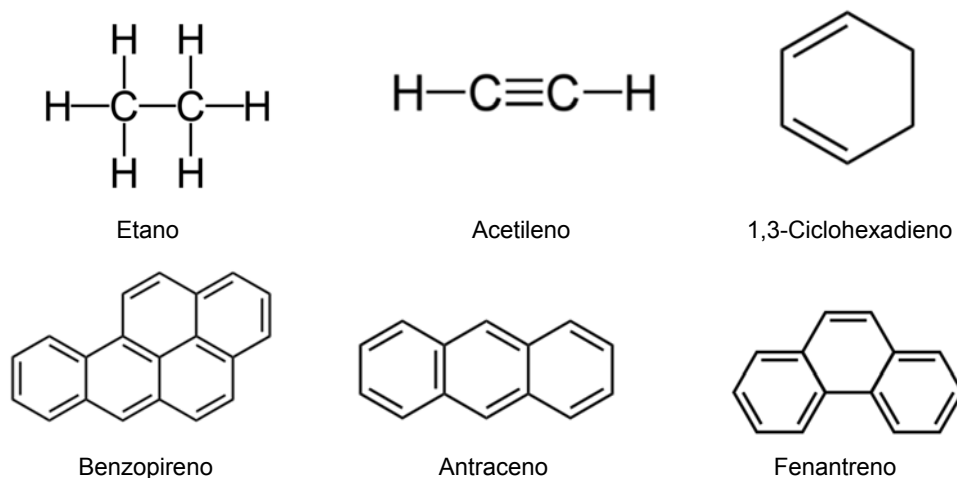


Figura 2.3: Ejemplos de hidrocarburos lineales y cíclicos.

Alquenos organoclorados

Un alqueno es hidrocarburo alifático con un doble enlace carbono = carbono. Los alquenos organoclorados se usaron en grandes volúmenes como solventes y desengrasantes. Un ejemplo de ellos es el tetracloroetileno (o tetracloroeteno, percloroetileno, PCE y Perc). Se utilizó en grandes cantidades como disolvente de limpieza en seco y desengrasante para piezas de metal. Otro ejemplo es el tricloroetileno (también llamado tricloroeteno, TCE, y Triclene), un

desengrasante y disolvente utilizado en varios procesos. En medicina se lo utilizaba anteriormente como anestésico general. Ambos alquenos organoclorados son inmiscibles y más densos que el agua, lo que le confiere las características de una clase importante de contaminantes conocida como Líquidos Densos de Fase No Acuosa (DNAPL) que se asocian con contaminación del agua subterránea.

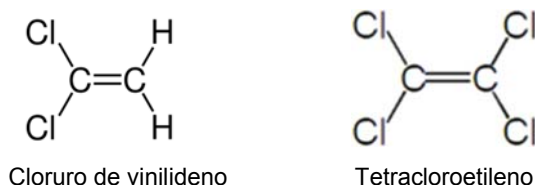
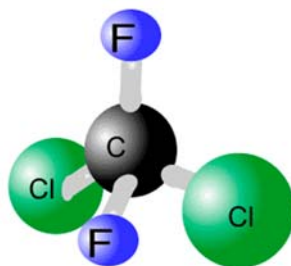


Figura 2.4: Ejemplos de compuestos organoclorados.

Clorofluorcarbonados (CFCs)

Los clorofluorcarbonos (CFC) son compuestos con átomos de C, F y Cl, y los hidroclorofluorocarbonos (HCFC), contienen además H₂. Se usaron ampliamente para la refrigeración, aire acondicionado, espumas para combatir incendios, producción de espuma de poliestireno y poliuretano. Además han sido utilizados en diversas aplicaciones de solventes tales como limpieza electrónica, propulsores como los de las latas de aerosol, y en el caso de 1-cloro-1,1-difluoroetano, como intermediario en la producción de fluoropolímeros. En general, no son tóxicos, son gases inodoros a temperatura ambiente que pueden hacerse líquidos fácilmente con una compresión suave (Bunce, 1991). Son moderadamente solubles en agua, tienen baja lipofilicidad, son compuestos muy estables, con una vida media mayor de 100 años. Por lo tanto, cuando son liberados a la atmósfera, no son degradados y alcanzan la estratósfera. Allí son irradiados por la luz UV y se descomponen rápidamente para liberar átomos de Cloro (o Bromo), los cuales comienzan una cadena de reacciones fotoquímicas que interfieren con el ozono estratosférico, teniendo como consecuencia la destrucción de este último. Se estima que un átomo de cloro, antes de ser neutralizado, puede destruir cien mil (100.000) moléculas de ozono. Los HCFC se introdujeron como sustitutos de los CFCs dada la menor capacidad para afectar la capa de ozono de la atmósfera debido a la presencia del átomo de hidrógeno, que hace que los HCFC sean más reactivos en la troposfera que los CFC.



Clorofluorcarbonados (CFCs)

Figura 2.5: Ejemplos de compuestos orgánicos clorofluorcarbonados de relevancia ambiental.

Bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas y furanos

Los bifenilos policlorados (PCBs, de su sigla en inglés) comprenden un grupo de compuestos orgánicos sintéticos, que difieren en el número y la posición de los átomos de cloro (1 a 10) unidos a dos anillos bifenilo Figura 2.6. Son mezclas de hasta 209 congéneres (compuestos clorados individuales) y aproximadamente 130 fueron fabricados para su uso comercial, siempre en forma de mezclas, y comercializados bajo los nombres Aroclor, Clophen, entre otros. Actualmente se encuentran prohibidos a nivel mundial y regulados por el Convenio de Estocolmo (UNEP 2001). Los PCB son líquidos aceitosos o sólidos que son generalmente incoloros o amarillo claro. No se conocen fuentes naturales de PCBs. Debido a sus propiedades físico-químicas, tales como la alta estabilidad térmica (hasta 800°C), baja inflamabilidad y baja conductividad eléctrica, los PCBs fueron ampliamente usados, entre 1930 y 1980, como agentes aislantes en condensadores y transformadores, y para diversos procesos industriales (plastificantes en lacas y pinturas, fluidos hidráulicos). La fabricación y uso de PCBs se prohibió mundialmente y hoy en día forman parte de la lista de Compuestos Orgánicos Persistentes, regulados por el Convenio de Estocolmo (PNUD 2003).

Se los divide en dos grandes grupos:

- PCBs non-orto o coplanares: son aquellos congéneres que no tienen átomos de cloro en el C2, o posición orto. Ambos anillos en estos compuestos pueden rotar libremente alrededor de la unión C-C.
- PCBs no-coplanares: son aquellos que tienen átomos de cloro en el C2, en uno o varios anillos. Los anillos de estos compuestos no pueden rotar libremente por impedimento estérico y por repulsión.

La toxicidad de los PCBs es crónica y entre sus efectos se encuentran daño al hígado, náuseas, vómitos y fatiga, disminución de la vitamina A, alteración del metabolismo lipídico, cambios hormonales, entre otros. Los congéneres más tóxicos son los non-orto o coplanares, debido a que tales PCBs son los que interactúan eficientemente con los receptores o sitios activos de las células. Los coplanares están presentes en las mezclas en un 1%, pero son los responsables del 95% de la toxicidad. Los productos fabricados antes de su prohibición que pueden contener PCB incluyen accesorios de iluminación fluorescente antiguos y dispositivos eléctricos que contienen condensadores de PCB, y microscopios antiguos y aceites hidráulicos y como aditivos para pinturas y aceites.

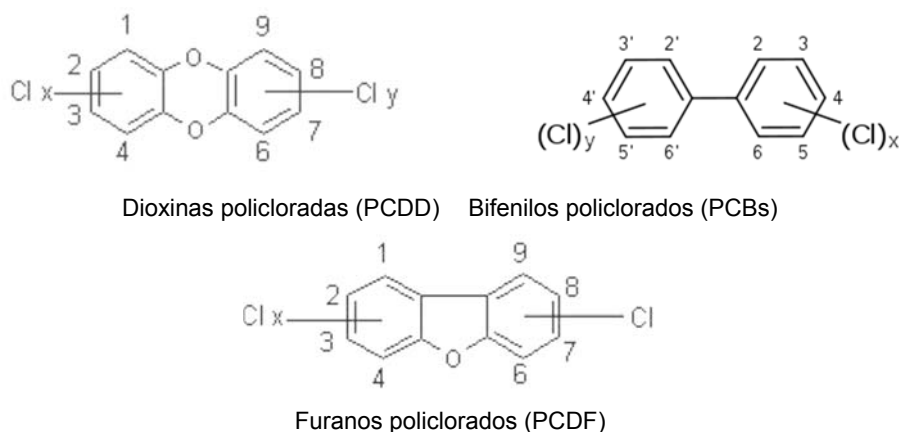


Figura 2.6: Estructuras básicas de los PCBs, las dioxinas y los furanos.

Las estructuras generales de las dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD) y los dibenzofuranos policlorados (PCDF) se proporcionan en la Figura 2.6. Los furanos tienen un anillo característico único que contiene O estabilizado por resonancia electrónica. Las dioxinas tienen un heterociclo con dos átomos de oxígeno. Se conocen un grupo de 75 congéneres de dibenzodioxinas policloradas y 135 congéneres de dibenzofuranos. No han sido fabricados intencionalmente, pero aparecieron como contaminantes durante incineración o síntesis de otros compuestos como los PCBs y algunos herbicidas (Bunce, 1991). Se pueden generar durante la combustión o blanqueamiento asociado con las fábricas de pasta de papel (kraft). Las dioxinas ingresan al medio ambiente también como contaminantes en herbicidas (por ejemplo, Agente Naranja) y conservantes de madera. Algunas dioxinas son extremadamente tóxicas. La dioxina más estudiada y más tóxica es la 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina, conocida comúnmente como 2,3,7,8-TCDD. Son los productos químicos más tóxicos sintetizado por el hombre.

Las personas pueden estar expuestas a dioxinas y furanos al ingerir alimentos con alto contenido de grasa, como productos lácteos, huevos, carne y algo de pescado debido a que se acumulan en los lípidos de la biota. Las exposiciones en el ambiente también incluyen quemas de desechos en industrias.

Las personas que han estado expuestas involuntariamente a grandes cantidades de estos químicos han desarrollado una afección de la piel llamada cloracné, problemas hepáticos y niveles elevados de lípidos (grasas) en la sangre. Los estudios en animales de laboratorio han demostrado varios efectos, incluidos cáncer y problemas reproductivos.

Ácidos perfluoroalquilos (PFAs)

Los ácidos perfluoroalquilos (PFA) son compuestos sintéticos y perfluorados. Están constituidos por ácidos orgánicos de cadena lineal o ramificada con una variedad de sitios reactivos, los cuales que incluyen, entre otros, grupos carboxilato o sulfonato (Giesy y Kannan, 2001, 2002). Los PFAs se fabrican y en algunos casos son liberados directamente al ambiente. Sin embargo, también se pueden formar a través de la transformación de varias moléculas precursoras que contienen un resto perfluoroalquilo, tales como alcoholes perfluorados y diversas sulfonamidas, alcoholes fluoroteloméricos (FTOH) y perfluoroalquilsulfonamidas. A todas estas sustancias se las conoce con el nombre de sustancias perfluoroalquilas (PFS). Los PFS son productos sintéticos que se fabrican desde hace más de 50 años (Giesy y Kannan, 2002). Se han utilizado en un gran número de productos comerciales, incluidos refrigerantes, tensioactivos, polímeros, productos farmacéuticos, agentes humectantes, lubricantes, adhesivos, plaguicidas, inhibidores de corrosión y tratamientos resistentes a las manchas para cuero, papel y ropa (Key et al. 1997). Otros usos han incluido espumas formadoras de película húmeda (AFFF) para extinción de incendios, minería y tensioactivos de pozos de petróleo, supresores de neblina ácida para baños de galvanoplastia y de grabado electrónico, limpiadores alcalinos, abrillantadores de suelos, fotográficos película, limpiadores de dentaduras postizas, champús y como insecticida para hormigas (Moody y Field, 2000).

Los PFS son contaminantes ubicuos en el ambiente y se biomagnifican, no tanto como los compuestos organoclorados, pero tienden a acumularse en la vida silvestre. Debido al enlace de alta energía carbono-flúor (C-F) y su estado altamente oxidado, los PFAs son en gran medida resistentes a los mecanismos de degradación bióticos y abióticos como la hidrólisis, fotólisis, degradación microbiana y metabolismo y, por lo tanto, son ambientalmente persistentes.

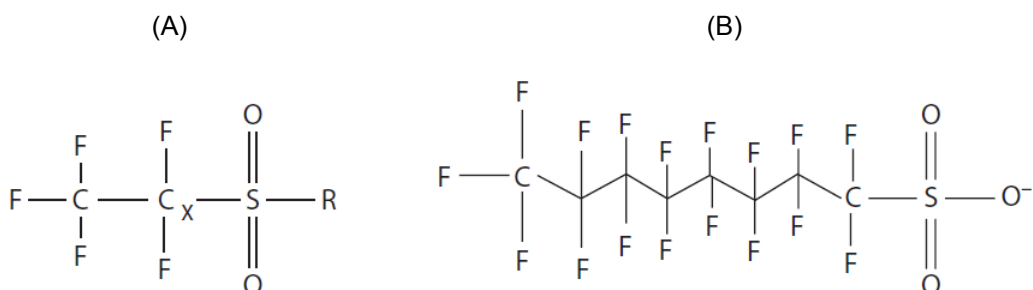


Figura 2.7: Estructura general de los PFAs (A) y un ejemplo de los sulfonatos de perfluorooctanos (B).

Plaguicidas

Según la definición de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO (1986), Plaguicida es “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga incluyendo: los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y subproductos o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes y las sustancias aplicadas a los cultivos antes y después de la cosecha para proteger al producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte. El término no incluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales.”

Además, se debe considerar otros plaguicidas que se usan para combatir plagas y vectores en el ámbito hogareño y en sanidad animal. Así, este grupo de sustancias químicas puede ser usado a nivel humano, agronómico, domisanitario y veterinario, y está sujeto a registros y reglamentaciones que incluyen sus prohibiciones. Los principales plaguicidas que se usan en la agricultura son herbicidas, insecticidas y fungicidas.

Desde el punto de vista toxicológico, las mezclas técnicas comerciales además del principio activo incluyen sustancias transportadoras y/o diluyentes como agua o solventes orgánicos, aditivos e impurezas, y, usualmente, el potencial tóxico de estas sustancias puede ser semejante o mayor que el propio principio activo.

El mayor riesgo del uso de plaguicidas es la contaminación ambiental, especialmente la dinámica dentro del medio ambiente, donde los plaguicidas pueden ingresar tanto a las cadenas

alimenticias como a los sistemas naturales de agua. Los factores a considerar respecto al comportamiento ambiental son la persistencia en el medio ambiente, volatilidad, y potencial de bioacumulación.

Los plaguicidas pueden clasificarse de diferente manera y con distinto grado de especificidad.

Según el hospedante sobre el cual actúa el plaguicida:

- Insecticidas.
- Acaricidas.
- Fungicidas.
- Nematocidas, desinfectantes del suelo y fumigantes.
- Herbicidas.
- Molusquicidas.
- Rodenticidas y varios similares.

Según el grupo químico al cual pertenecen:

Respecto al grupo químico, es importante conocer las características dado que desde el punto de vista toxicológico, los productos de un mismo grupo producen intoxicaciones análogas y un comportamiento ambiental similar. Algunos ejemplos dentro de los grupos según la plaga que actúan:

Insecticidas:

Clorados: Este grupo se encuentra prohibido a nivel mundial y forma parte de la lista de Compuestos Orgánicos Persistentes, regulados por el Convenio de Estocolmo (UNEP, 2003) debido a sus características de toxicidad y persistencia: DDT, clordano, lindano, metoxicloro, endosulfán, heptacloro, aldrin, dieldrin, endrin, HCHs.

Organofosforados: Clorpirifos, acefato,, diazinon, dimetoato, etión, fenitrotión, triclorfón, mercaptotión, metil azinfos, metidation.

Carbamatos: carbofurán, carbosulfán, metomil, pirimicarb, formetanato, etc.

Piretroides: cipermetrina, ciflutrina, deltametrina, esfenvalerato, permetrina, lambdacialotrina, etc.

Neonicotinoides: tiametoxam, acetamiprid, imidacloprid.

Benzoilureas: novalurón, clorfluazurón, teflubenzurón, etc.

Fungicidas:

Metoxiacrilatos: azoxistrobina.

Triazoles: epoxiconazole, ciproconazole, difenoconazole, propiconazole, fenbuconazole, flutriafol, tebuconazole.

Bencimidazoles: carbendazim, tiabendazol, metil tiofanato.

Derivado del benceno: clorotalonil.

Ditiocarbamato: mancozeb.

Herbicidas:**Derivados de la glicina:** glifosato**Imidazolinonas:** imazaquim, imazetapir, imazapir.**Triazinas:** Prometrina, atrazina**Acetanilidas:** acetoclor, alaclor.**Derivados benzoicos:** dicamba.**Benzonitrilos:** Bromoxinil.**Diazinas:** Bentazón.**Bipiridilos:** paraquat y diquat

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los plaguicidas principalmente con base a su toxicidad aguda en estudios con animales. Los plaguicidas se clasifican en las siguientes clases: extremadamente peligrosos (Ia), altamente peligrosos (Ib), moderadamente peligrosos (II), poco peligrosos (III), normalmente no ofrecen peligro bajo uso adecuado (IV). Todos los plaguicidas agrícolas son tóxicos, entendiendo por toxicidad a la capacidad de una sustancia o sus metabolitos de causar, en una determinada dosis, daño a la salud.

Plaguicidas organoclorados

Conforman un grupo de plaguicidas sintéticos desarrollados principalmente para controlar las poblaciones de insectos plaga. Su origen se remonta a la fabricación del DDT (dicloro difenil tricloroetano) en 1943. Durante varias décadas fue un plaguicida muy importante en la lucha química y control del mosquito *Anopheles sp.*, transmisor de la malaria. Los plaguicidas organoclorados son hidrocarburos con alto contenido de átomos de cloro. Su acción, es a nivel del sistema nervioso, generando alteraciones de la transmisión del impulso nervioso. Ejemplos de estos plaguicidas son aldrín, clordano, dieldrín, endrín, heptacloro, DDTs, HCHs (hexaclorociclohexanos), lindano, endosulfán y toxafeno. Actualmente se encuentran prohibidos a nivel mundial y forman parte de la Lista de Compuestos Orgánicos Persistentes, regulados por el Convenio de Estocolmo (UNEP, 2003) debido a sus características de toxicidad, persistencia, alta lipofiliidad, volatilidad y acumulación. Pueden tener una persistencia de hasta 30 años en suelos y poseen toxicidad crónica. Son contaminantes ubicuos, se refiere a la presencia de estos compuestos en todos los compartimientos ambientales de un ecosistema (agua, aire, suelo y biota). Debido a sus características recalcitrantes, se bioacumulan y biomagnifican en las cadenas tróficas pudiendo a su vez provocar efectos adversos en el ambiente. Dentro de la toxicidad crónica que presentan son carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos y disruptores endocrinos.

De acuerdo a su estructura molecular se clasifican en cinco grupos: I) DDT y metabolitos diclorofenil tricloroetano); II) Ciclodienos; III) HCH (Hexaclorociclohexano); IV) Toxafeno; V) Pentaciclodecano.

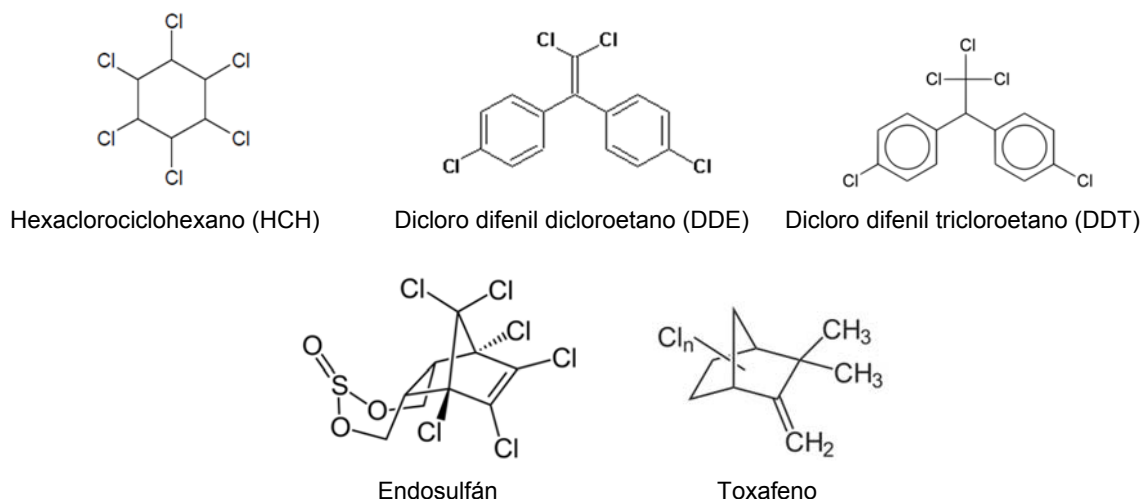


Figura 2.8: Ejemplos de plaguicidas organoclorados

Plaguicidas organofosforados, carbamatos, piretroides y neonicotinoides

Los plaguicidas **organofosforados** tienen una vida media más corta que los organoclorados. Sin embargo, tienden a ser más tóxicos para los mamíferos que los plaguicidas organoclorados y, a menudo, son involucrados en envenenamientos de humanos por plaguicidas. También algunos pueden acumularse en grasas y aceites de organismos. El modo de acción de estos compuestos es la inhibición de actividad acetilcolinesterasa, siendo neurotóxicos.

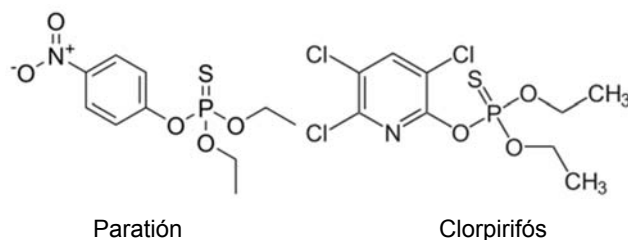


Figura 2.9: Ejemplos de plaguicidas organofosforados.

Por su parte, los **carbamatos**, al igual que los organofosforados, se degradan rápidamente en el medio ambiente y pueden causar disfunción neural al inhibir la acetilcolinesterasa. Los carbamatos tienen una alta toxicidad aguda para los mamíferos, pero sus toxicidades tienden a ser más bajas que las de los organofosforados. Se derivan del ácido carbámico (H_2NCOOH), teniendo la estructura general de $\text{R}_1 - \text{NH} - \text{COO} - \text{R}_2$ (Manahan, 1993).

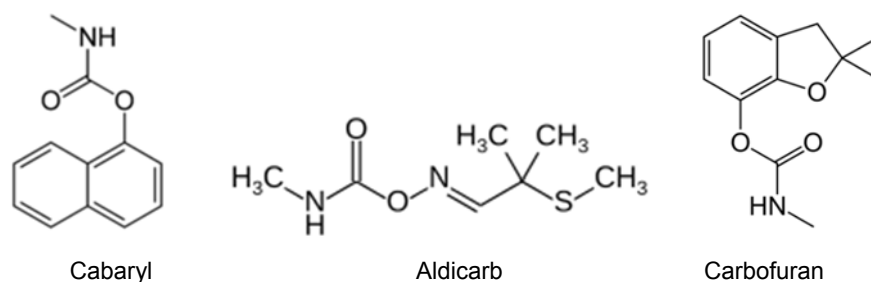


Figura 2.10: Ejemplos de plaguicidas carbamatos.

Los **piretroides**, junto con la rotenona, y los insecticidas neonicotinoides, son similares a los plaguicidas naturales producidos por las plantas. Las piretrinas son extraídas de las flores del piretro, y se usaron como plaguicidas a principios de 1800 (Tomizawa y Casida, 2005). Son neurotóxicos y los efectos de los piretroides son el resultado de su interferencia con el funcionamiento normal de los canales de sodio en células nerviosas y otros tejidos excitables. Todos son similares al piretro producido por las plantas, *Chrysanthemum cinereum* y *C. cinerariaefolium*. Algunos son productos naturales, aunque ahora son producidos sintéticamente. Los compuestos naturales son llamados piretrinas y sus análogos sintéticos o derivados se llaman piretroides. La aletrina y permetrina son plaguicidas análogos de compuestos naturales (es decir, son piretroides) que no incorporan un grupo ciano (triple enlace C y N) en sus estructuras y se los denominan piretroides tipo I. El fenvalerato, que contiene un grupo ciano, representa los piretroides tipo II. Los síntomas de intoxicación aguda se manifiestan de manera diferente para los piretroides tipo I y II. La mayoría de estos plaguicidas son utilizados como mezclas de isómeros. Debido a que se degradan rápidamente, la mayoría de los problemas ambientales están asociados con exposiciones agudas.

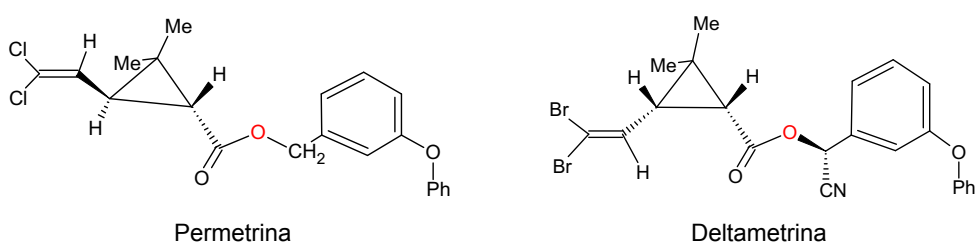


Figura 2.11: Ejemplos de plaguicidas piretroides.

La nicotina tiene una larga historia de uso como plaguicida y los **neonicotinoides** son modificaciones de este alcaloide producido naturalmente. El desarrollo de los neonicotinoides comenzó en la década de 1970, y desde entonces, los derivados de nicotina han surgido como la clase reciente de insecticidas a desarrollar. Actualmente representan el 17% de todas las ventas mundiales de insecticidas, siendo el imidacloprid uno de los más utilizados en el mercado desde 1992 (Kagabu, 1997). Actúan como agonistas de los receptores de acetilcolina nicotínicos post-

sinápticos de los insectos. La toxicidad de estos insecticidas sistémicos para mamíferos, aves, y peces es relativamente baja. Tienen baja lipofilicidad, (valores de Log Kow en el rango de -0.66 a 1.26). Si bien presentan riesgo bajo para las especies no blanco, existe una alta preocupación por el impacto adverso sobre insectos polinizadores. Los consumidores de néctar y polen están expuestos generalmente a niveles dañinos de plaguicidas sistémicos, reduciendo teóricamente la eficiencia del forrajeo y también la cría de abejas jóvenes (Dicks, 2013). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) publicó sus inquietudes sobre el riesgo para las abejas como resultado de los usos actuales de clotianidina (EFSA, 2013a), imidacloprid (EFSA, 2013b) y tiametoxam (EFSA, 2013c); como así también en las neuronas cerebelosas de los mamíferos (Kimura-Kuroda et al. 2012).

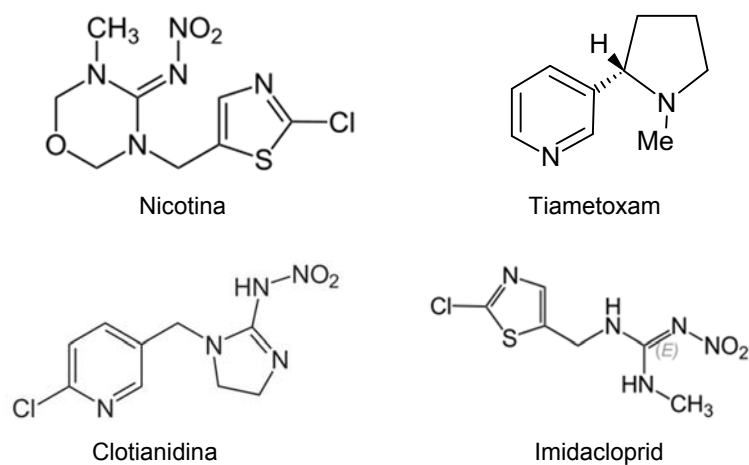


Figura 2.12: Ejemplos de plaguicidas neonicotinoides.

Herbicidas

Estos plaguicidas incluyen productos como los bipiridilos, paraquat y diquat que tienen anillos heterocíclicos de nitrógeno en sus estructuras. Los anillos son aromáticos porque los electrones asociados estabilizan las estructuras al estar en resonancia dentro de los anillos. Dentro del grupo de las triazinas encontramos a la atrazina con un comportamiento ambiental que supone su ingreso a los cuerpos de agua adyacentes a campos agrícolas como así también lixiviación hacia capas más profundas del suelo.

Los fenoxi herbicidas (ej., 2,4-D) también son importantes en el control de las dicotiledóneas y su función está relacionada con la alteración de la regulación del crecimiento de la planta.

El glifosato [N-(phosphonomethyl) glycine] (GLY) es un herbicida no selectivo, de post-emergencia, de amplio espectro, ampliamente utilizado para el control de malezas. Ha sido introducido en la década del 70' como principio activo del formulado Round Up®. Es posiblemente el herbicida más utilizado en la actualidad en todo el mundo. Diversos estudios han demostrado que una vez aplicado, es fuertemente adsorbido por los componentes del suelo, tales como arcillas, óxidos de hierro y ácidos húmicos. Asimismo, es en su mayoría degradado, principalmente por acción

biológica, siendo su metabolito mayoritario el ácido aminometilfosfónico (AMPA). Estas propiedades conllevan a suponer que no sería previsible su presencia en altas concentraciones en las aguas subterráneas y/o superficiales. Sin embargo, diversos autores han informado niveles de GLY y AMPA del orden de ppb en aguas superficiales.

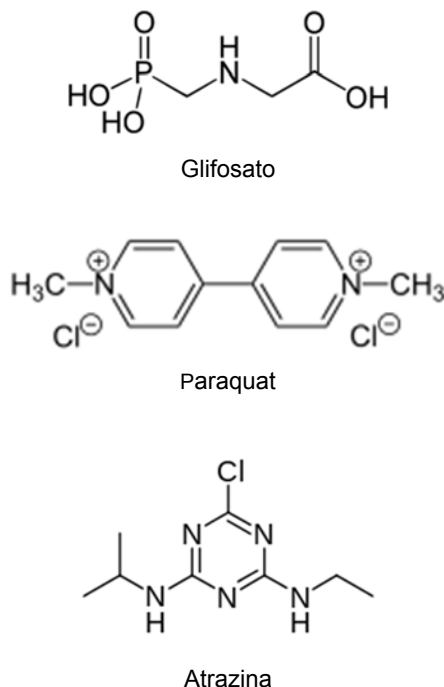


Figura 2.13: Ejemplos de herbicidas de uso frecuente.

Alquilbencenos-sulfonatos, perfluoro-alquil-sulfonatos

Los tensioactivos o surfactantes presentes en los limpiadores y detergentes liberados al medio ambiente tienen en sus estructuras, regiones hidrofílicas e hidrofóbicas para facilitar su función. En la década del 60', los tensioactivos comerciales conocidos como alquil benceno sulfonatos (ABS) fueron ampliamente utilizados. Son resistentes a la degradación ambiental y han causado problemas en los sistemas acuáticos. Por lo tanto, la lenta biodegradación provocó su reemplazo por el alquil benceno sulfonato lineal (LAS), el cual es degradado más fácilmente ya que carece de ramificaciones en sus cadenas alifáticas (Manahan, 1993).

Los LAS se usan ampliamente en detergentes, incluidos productos para el hogar y de cuidado personal. Se encuentran presentes como una mezcla compleja de homólogos con una longitud promedio de cadena de alquiles de 12 carbonos. Se degradan más fácilmente que los ABS en el medio ambiente por microorganismos y, en consecuencia, varios de los problemas encontrados en la década del 60' en sistemas acuáticos se han reducido.

La estructura general de los perfluoroalquil sulfonatos (PFAS) se muestra en la Figura 2.14. Estos compuestos son utilizados para fabricar recubrimientos de fluoropolímero y productos que resisten el calor, el aceite, las manchas, la grasa y el agua. Los recubrimientos de fluoropolímero se pueden usar en productos tan variados como ropa, muebles, adhesivos, empaques

de alimentos, superficies de cocción antiadherentes resistentes al calor y el aislamiento de cables eléctricos. También se utilizan en espumas contra incendios. El sulfonato de perfluorooctano (PFOS) es el PFAS más ampliamente detectado en el medio ambiente. Dentro de este grupo, el PFOS y el ácido perfluorooctanoico (PFOA), han sido motivo de preocupación porque no se descomponen en el medio ambiente, pueden moverse a través del suelo y contaminar las fuentes de agua potable, y se bioacumulan en peces y vida silvestre. PFAS se ha encontrado en ríos y lagos y en una gran variedad de animales terrestres y acuáticos. La persistencia y distribución generalizada de PFAS en el medio ambiente provocaron restricciones de su uso en algunos países de la Unión Europea, y la incorporación de PFOS y compuestos relacionados a la lista de Poluentes Orgánicos Persistentes regulados por el Convenio de Estocolmo, indicando su prohibición.

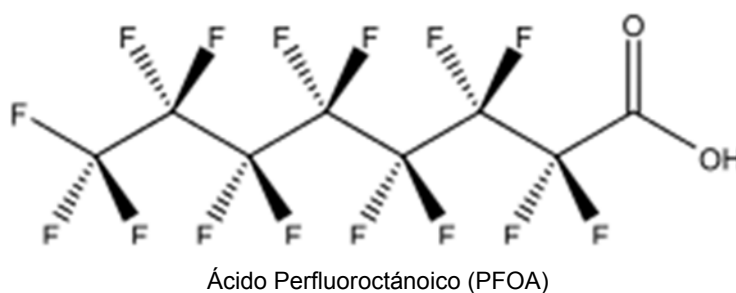
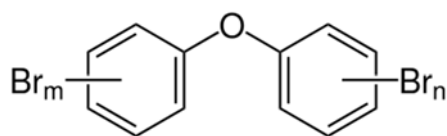


Figura 2.14: Estructura general de los perfluoroalquil sulfonatos (PFAS).

Éteres de difenilos polibromados (PBDEs)

Los PBDEs han sido ampliamente utilizados en todo el mundo como retardantes de llama para reducir el riesgo de incendio en plásticos, alfombras, equipos electrónicos, textiles y materiales de construcción. Son estructuralmente similares a otros compuestos persistentes como dioxinas, furanos y PCBs. Actualmente se encuentran prohibidos en la mayoría de los países a nivel mundial, y están regulados por el Convenio de Estocolmo (UNEP 2011). En la actualidad, se han encontrado PBDEs en matrices bióticas y abióticas, incluidos, peces, invertebrados, aves marinas, mamíferos marinos y seres humanos. El congénere BDE-47 es el más abundante en tejidos ambientales, seguido por BDE-99, -100, -153 y -154. Hoy en día están prohibidos y regulados por el Convenio de Estocolmo. Las formulaciones comerciales pueden ser penta-BDE, que contienen predominantemente BDE- 47 y -99, y representó el 10% del mercado BDE, mientras que la producción de mezclas de octa-y deca-BDE (congénere 209) representó el 15 y 75%, respectivamente. Las mezclas comerciales de octa-BDE contienen tetra y pentabromados sólo como contaminantes menores. El predominio de congéneres bromados livianos en la biota, puede deberse a una biodisponibilidad y bioacumulación preferencial de estos BDE, desbrominación de los congéneres más pesados, o factores como el transporte y la estabilidad en el ambiente.



Polibromodifenil éteres (PBDE)

Figura 2.15: Estructura general de los difenilos polibromados (PBDEs).

Contaminantes emergentes: productos farmacéuticos y de cuidado personal

Algunos productos farmacéuticos, como los antibióticos están destinados a matar o controlar virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos metazoos. Otros productos farmacéuticos humanos relevantes conforman los antiinflamatorios, β -bloqueantes, antiepilépticos, analgésicos, antidepresivos, y agentes hormonalmente activos. Los medicamentos veterinarios también incluyen promotores de crecimiento (Boxall et al. 2003). Varias de estas sustancias plantean riesgos en los ecosistemas bajo ciertas combinaciones de ruta de administración, metabolismo dentro organismos expuestos, degradación ambiental y reparto entre fases ambientales. Su aplicación concentrada en la producción ganadera intensiva o la acuicultura puede dar lugar a grandes cantidades presentes en el entorno inmediato, por ejemplo, uso intensivo de ivermectina para el control de endoparásitos en corrales de ganado. La aplicación a la tierra de estiércol o biosólidos puede dar como resultado una liberación crónica en otros entornos. Entre las clases más relevantes de los productos farmacéuticos para humanos y veterinarios se encuentran los análogos hormonales y sus metabolitos. Los efectos de tales productos químicos surgieron en la década de 1970 cuando se les proporcionó a mujeres embarazadas con riesgo de aborto espontáneo, dietilestilbestrol (DES) un agente que actuaba como la hormona estradiol con el objeto de mantener el embarazo. Luego con la aparición de casos de cánceres en madres que habían consumido DES, se detuvo su uso en humanos. Hoy en día, con fines anticonceptivos se utiliza el análogo de 17 β -estradiol 17 α -etinilestradiol (EE2). De igual manera ocurre con el ganado con fines de control reproductivo, promoción del crecimiento o aumento de la producción de leche. Estos análogos hormonales y sus metabolitos llegan al medio ambiente a través de las descargas de las plantas de tratamiento de aguas residuales, o drenajes de las instalaciones de ganado o aves de corral, entre otros. Diversos efectos ecotoxicológicos han sido informados en diferentes organismos, tales como peces, mostrando una reproducción deteriorada cuando fueron expuestos al etinilestradiol (Nash et al. 2004) y desarrollo sexual modificado al ser expuestos al andrógeno sintético, 17 α -metiltestosterona (Pawlowski et al. 2004).

El grupo de los contaminantes emergentes comprende productos químicos sintéticos o naturales que no se monitorean comúnmente en el ambiente, pero que tienen el potencial de ingresar al medio ambiente y causar efectos adversos para la salud humana y/o ecológica. Consisten en productos farmacéuticos para humanos y veterinarios, plaguicidas, productos químicos industriales, tensioactivos y productos para el cuidado personal que se encuentran fácilmente en aguas

subterráneas, aguas superficiales, aguas residuales municipales, agua potable y fuentes de alimentos. También incluyen compuestos que alteran el sistema endocrino, analgésicos, antibióticos, hormonas y una amplia gama de otros fármacos. La amenaza radica en el hecho de que la toxicología ambiental y humana de la mayoría de estos compuestos aún no se ha estudiado.

Bisfenol A (BPA)

El bisfenol A consiste en dos anillos fenólicos unidos a una molécula de propano de forma simétrica. El nombre técnico es, 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano. Se usa para fabricar plásticos policarbonato utilizados en algunos tipos de envases de bebidas, discos compactos, vajillas de plástico, equipos de seguridad resistentes a los impactos, piezas de automóviles y juguetes. Las resinas epoxi de BPA se utilizan en los revestimientos protectores de latas de alimentos, en selladores dentales y en otros productos.

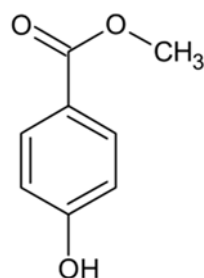
La exposición general a niveles bajos de BPA está relacionada con ingerir alimentos o agua almacenada en recipientes que tengan recubrimientos de BPA, ya que el BPA migra hacia el agua o los alimentos. Esta migración depende de varios factores, tales como el tipo de plástico, el tiempo de contacto (a mayor tiempo, mayor migración), la temperatura (a mayor temperatura, mayor migración), el pH (la migración es mayor en bebidas carbonatadas y alimentos ácidos como la salsa de tomate o zumos de cítricos, o sea, a $\text{pH} < 7$), la degradación del plástico (tiempo de uso, desgaste, lesiones) y el tipo de alimento. Los niños pequeños pueden estar expuestos por contacto boca a boca y contacto oral directo (boca) con materiales que contienen BPA. El tratamiento dental con selladores que contienen BPA también da como resultado una exposición a corto plazo. Además, los trabajadores que fabrican productos que contienen BPA pueden estar expuestos de una manera más directa.

La estructura molecular del BPA mimetiza la estructura de los estrógenos naturales, alterando el sistema endocrino. Por lo tanto, el BPA constituye, un “disruptor endocrino”.

Parabenos

Los parabenos son ésteres del ácido p-hidroxibenzoico. Por ello, a las sales derivadas de estos compuestos se denominan PHB, iniciales de para-Hidroxi Benzoato. Son productos químicos artificiales que a menudo se usan en pequeñas cantidades como conservantes en cosméticos, productos farmacéuticos, alimentos y bebidas. Los parabenos más comunes son metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno y butilparabeno. Generalmente se usa más de un parabeno en un solo producto. Todos los parabenos usados comercialmente son producidos de forma sintética, aunque algunos de ellos se pueden encontrar en la naturaleza.

Los seres humanos pueden estar expuestos a los parabenos al tocar, o ingerir productos que contienen parabenos. Algunos productos, como maquillaje, humectantes, productos para el cuidado del cabello y cremas de afeitar, contienen parabenos y en estos casos se absorben a través de la piel. Los parabenos que ingresan al cuerpo se excretan rápidamente.



Metil 4-hidroxibenzoato

Figura 2.16: Ejemplo de parabenos.

Ftalatos

Los ftalatos se usan ampliamente en plásticos, especialmente en cloruro de polivinilo. También son incorporados en adhesivos y pinturas. Su uso generalizado y su capacidad para modificar la función endocrina, han generado una gran preocupación por la contaminación por ftalatos.

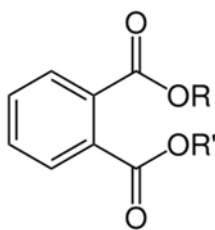


Figura 2.17: Estructura general de los ftalatos.

Nanomateriales

Los nanomateriales son materiales naturales y artificiales que tienen al menos una dimensión de 100 nm. o menos (Peralta-Videa et al. 2011): las nanopartículas son nanomateriales con mínimamente dos dimensiones estando entre 1 y 100 nm. Aunque las nanopartículas pueden ser de origen natural como en el caso de la sílice y fibras de asbesto, el término se usa más comúnmente para partículas fabricadas. Las fuentes de nanopartículas incluyen incendios, volcanes, magnetita producida biológicamente y ferritina (Oberdörster et al. 2007). Por su parte, las fuentes antropogénicas incluyen fuentes no intencionales, como motores de combustión interna, fundiciones, y motores eléctricos. Las nanopartículas también incluyen partículas diseñadas intencionalmente.

El interés en los efectos nocivos de los nanomateriales se amplió rápidamente a partir de productos naturales (ej., fibras de asbesto), asociados a la industria (ej., sílice) y derivados de la combustión (ej., hollín de diesel) para abarcar una amplia gama de materiales de ingeniería. Nanomateriales artificiales se utilizan en productos que incluyen electrónica, óptica, textiles, dispositivos médicos, productos farmacéuticos, cosméticos, envases, tecnologías de tratamiento de agua, celdas de combustible, catalizadores, biosensores y biorremediación materiales (Ju-Nam y Lead, 2008). Estos nuevos materiales incluyen nanotubos de carbono de pared simple y doble,

metálicos, óxido metálico, hidróxido metálico, punto cuántico y nanopartículas de poliestireno que se pueden clasificar en términos generales de la siguiente manera (Peralta-Videa et al. 2011):

Orgánicos

Fullerenos (C₆₀ and C₇₀)*

Nanotubos de carbono

Nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs)

Nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs)

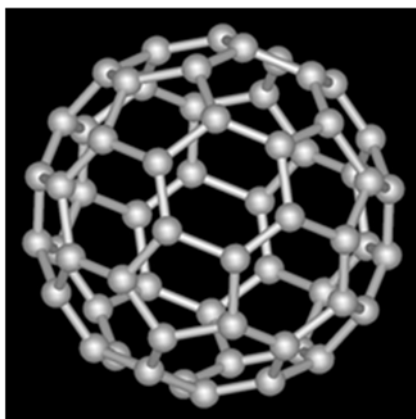
Inorgánicos

Óxidos Metálicos (ej., CeO₂, Fe₃O₄, Fe₂O₃, TiO₂, ZnO₂, and ZnO)

Metales (ej., Au and Ag)

Puntos cuánticos (CdSe)

Un fullereno es una molécula grande compuesta de 60 o más átomos de carbono con forma de esfera hueca, elipsoide, o tubo. El C₆₀ y C₇₀ se refiere al número de átomos de carbono en la molécula, siendo C₆₀ el esférico conocido y ampliamente utilizado.



Buckminster fullereno (C₆₀)

Figura 2.18: Ejemplo de una nanopartícula orgánica.

Algunos nanomateriales pueden estar formados por mezclas de estas clases de compuestos. Una de las principales aplicaciones de las nanopartículas de plata es utilizarlas como bactericida incorporándolas en varios productos. Las nanopartículas de oro son más inertes que las de plata. Los iones metálicos también pueden ser liberados de los puntos cuánticos una vez que ingresan al medio ambiente. Otro ejemplo es el ion de plata liberado de las nanopartículas de plata que puede ser tóxico para organismos acuáticos o del suelo.

Microplásticos

Los microplásticos, son pequeños trozos de plástico, de menos de 5 mm de longitud, que se encuentran en el medio ambiente como consecuencia de la contaminación plástica. Los microplásticos están presentes en una variedad de productos, desde cosméticos hasta ropa sintética,

bolsas y botellas de plástico. Varios de estos productos entran fácilmente al medio ambiente con desechos y otros se forman por la ruptura de piezas más grandes de plásticos. Los microplásticos consisten de átomos de carbono e hidrógeno unidos entre sí en cadenas de polímeros. Otros productos químicos, considerados como aditivos, como ftalatos, PBDEs y el tetrabromobisfenol A (TBBPA), también suelen estar presentes en los microplásticos.

Los microplásticos se dividen en dos tipos: primarios y secundarios. Dentro de los primarios se incluyen microperlas que se encuentran en productos para el cuidado personal, pellets de plástico utilizados en la fabricación industrial y fibras de plástico utilizadas en textiles sintéticos (por ejemplo, nylon). Los microplásticos primarios ingresan al medio ambiente directamente a través de por ejemplo, uso de productos de cuidado personal que se liberan en los sistemas de aguas residuales de los hogares, pérdida involuntaria por derrames durante la fabricación o transporte, o abrasión durante el lavado (por ejemplo, lavado de ropa hecha con textiles sintéticos). Los microplásticos secundarios se forman a partir de la descomposición de plásticos más grandes. Generalmente ocurre cuando los plásticos más grandes se someten a la intemperie, la acción de las olas, la abrasión del viento, oxidación y la radiación ultravioleta de la luz solar. Además, debido a la gran relación superficie/volumen, pueden adsorber contaminantes en sus superficies, tales como metales pesados, plastificantes, contaminantes orgánicos persistentes, entre otros. A pesar de que se conoce la existencia de los microplásticos desde hace varias décadas, solamente desde hace diez años que se los comenzó a investigar profundamente. Estos contaminantes están presentes en todos los mares del mundo y pueden causar daño a las especies y comunidades que viven en esos ecosistemas.

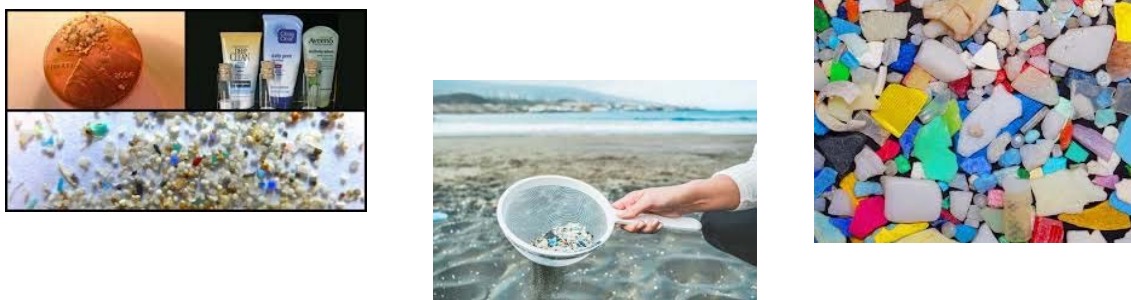


Figura 2.19: Aspecto general de los microplásticos.

Físicos

Radiactividad

Un nucleído es un núcleo con un número específico de neutrones y protones. El número de protones y neutrones en un nucleído se designa con un número superíndice delante de su símbolo (^{15}N) o un número separado de su nombre por un guión (nitrógeno-15). Los electrones alrededor del núcleo pueden cambiar, por ejemplo, ^{131}I y $^{131}\text{I}^-$, pero el nucleído sigue siendo el mismo. Algunos nucleídos son estables pero otros son inestables. Los isótopos naturales de

nitrógeno, ^{14}N y ^{15}N , son nucleídos estables (los isótopos son átomos con el mismo número de protones pero con números diferentes de neutrones).

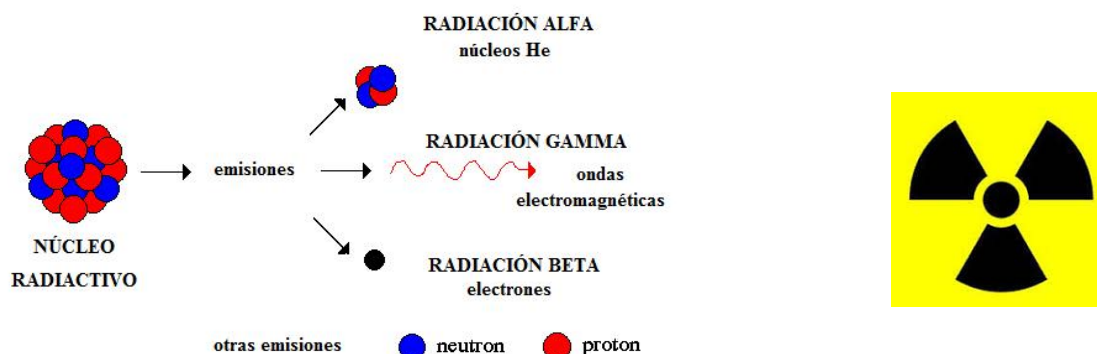


Figura 2.20: Desintegración radioactiva de la materia.

El término radiación se refiere a la propagación de energía a través del espacio. Esto puede ser en forma de fotones, núcleos atómicos expulsados o sus fragmentos, o partículas subatómicas. Energía calorífica, visible y luz ultravioleta (UV), los rayos X y los rayos gamma (γ) son ejemplos de radiaciones que son fotones o energía electromagnética. Las radiaciones también se generan dentro de los núcleos de elementos inestables: dichos núcleos se denominan radionucleidos, y sus radiaciones emitidas incluyen partículas alfa (α) (núcleos helio con una carga +2), partículas beta (β) (electrones o positrones con una carga -1 o $+1$), y fotones γ . Los neutrones (que no tienen carga) y los protones (que tienen una carga $+1$) pueden interactuar con otros núcleos atómicos pero no son emitidos por radionucleídos (aunque se emiten si otros átomos son excitados por radiaciones). Los radionúclidos emiten estas partículas y fotones para alcanzar un estado con mayor estabilidad. Algunos lo hacen rápidamente pero otros se descomponen lentamente, lo que resulta en diferencias en la tasa de desintegración radioactiva. Algunos decaen a través de una secuencia de nucleídos inestables o metaestables (series de decaimiento) hasta que se produce el nucleído más estable.

Los neutrones pueden crear radionucleídos cuando son generados por procesos antropogénicos. El cobalto-60 (^{60}Co) es un ejemplo de un radionucleído fabricado usando neutrones en reactores nucleares. Se utiliza como fuente de radiación y en instalaciones de irradiación.

Hay muchas fuentes de radiaciones que pueden afectar a los organismos. Las radiaciones se generan naturalmente a través de la descomposición de elementos radiactivos en la tierra. Todos estos radionucleídos fueron originalmente formados en los núcleos de estrellas que no sean nuestro sol, o a través de la serie de descomposición de los elementos como el uranio o torio (que se descompone lentamente y, a su vez, produce elementos radiactivos como el polonio, radio y radón). Las radiaciones que provienen desde fuera de la tierra incluyen rayos cósmicos, que son predominantemente los núcleos libres de electrones de los átomos de hierro (Fe^{23+}), protones emitidos desde el sol y neutrinos subatómicos que inciden

en la atmósfera de la tierra (o son producidos por radiaciones extraterrestres en la atmósfera). Aunque estas radiaciones rara vez interactúan directamente con el tejido vivo, pueden ser importantes porque pueden reaccionar con gases atmosféricos y producir radionucleídos cosmogénicos (especialmente ^3H y ^{14}C) que pueden incorporarse a los organismos.

Las emisiones radiactivas de la corteza terrestre se combinan con la radiación atmosférica de modo que la dosis de radiación total al nivel del mar se divide aproximadamente en partes iguales entre los dos. A mayor altitud, mayor exposición a la radiación desde el cosmos ya que aumenta aproximadamente dos veces por cada 1.6 km de aumento de altitud. La latitud también afecta la exposición a la radiación. El campo magnético de la Tierra desvía las partículas cargadas cerca del Ecuador, pero los canaliza a la atmósfera en los polos magnéticos. Además de estas fuentes naturales, la radiación se genera a partir de la producción de armas nucleares y pruebas, producción de energía nuclear y numerosas aplicaciones médicas, de investigación e industriales.

Las radiaciones infrarrojas y UV, los rayos γ y los rayos X son radiaciones electromagnéticas. Gama- (γ) y los rayos X tienen energías más altas (longitudes de onda más cortas) que la radiación infrarroja y UV, y sus longitudes de onda y las energías pueden superponerse.

A diferencia de la radiación electromagnética que se acaba de describir, las radiaciones α y β implican emisión de partículas del núcleo. Una partícula α está compuesta de un núcleo de helio (2 neutrones y 2 protones) expulsado durante la desintegración radiactiva. Las emisiones α penetran solo micrómetros en el tejido. Esta es la razón por la cual los radionucleídos emisores de α crean un riesgo insignificante fuera del cuerpo. Pero ellos pueden producir daños extensos incluso en cantidades mínimas si se inhala o ingiere. Es decir tienen bajo poder de penetración y alta intensidad.

Las partículas β son un electrón (negatrón o β^-) o un positrón (β^+). Cualquiera puede ser liberado durante desintegración nuclear. Considerando la masa como carga, las partículas α y β interactúan más con los tejidos vivos que los fotones electromagnéticos. Sin embargo, estas mismas cualidades también restringen su penetración en tejidos.

La radiación puede ser ionizante, en cuyo caso se generan pares de iones cuando la radiación interactúa y cede energía a la materia. Por ejemplo, rayos γ y X, y quizás algunos fotones energéticos UV en nuestro entorno serían radiaciones ionizantes. Por supuesto, las partículas α y β también producen pares de iones en la materia, incluida la materia que forma el tejido vivo.

*Rayos: cósmicos, α , β , γ , X y UV: se denominan **radiaciones ionizantes**, porque su acción sobre la materia se traduce en "arranque" de e^- de las capas periféricas de los átomos **con formación de iones**.*

La producción de iones a lo largo de las vías recorridas por la radiación a través de los tejidos es la causa principal de daño inducido por la radiación. La naturaleza de las interacciones de la radiación con los tejidos vivos depende de la energía de la radiación (longitud de onda), masa y carga.

Un fotón de rayos X sin masa y de alta energía pasa fácilmente a través de los tejidos, mientras que la partícula α con masa y cargada tendrá una penetración limitada. Sin embargo, la cantidad de energía que una partícula α puede transferir al tejido durante la interacción será muy alta en relación con la de una radiografía.

El gas radón puede usarse para ilustrar que el nivel de exposición a la radiación está influido por la naturaleza y cantidad de una fuente, tasa de desintegración radiactiva y posible generación en una serie de desintegración de un elemento. El gas radiactivo, ^{222}Rn , se libera en la biosfera como un producto de la serie natural de descomposición de uranio-radio.

El ^{222}Rn tiene una vida media relativamente corta (3.8 días) y produce metales sólidos emisores de partículas α , como es el caso del polonio que precipita en los pulmones cuando el ^{222}Rn es inhalado. La deposición local (pulmones) de grandes cantidades de energía de la partícula α da como resultado daño tisular y potencialmente cáncer. Por lo tanto, las cantidades de energía en el tejido pulmonar a través de partículas α , hacen que la exposición a ^{222}Rn sea altamente preocupante.

Temperatura

La contaminación térmica es cualquier cambio en las condiciones térmicas ambientales de magnitud suficiente para impactar negativamente en el bienestar humano o ecológico. La escala de contaminación térmica puede ser desde local, como en el caso de una descarga de una planta de producción de energía, hasta global como en el caso del calentamiento global. La contaminación térmica localizada en la atmósfera y la hidrosfera tiene una larga historia de estudio. Más recientemente, la escala de consideración para la contaminación térmica se ha expandido para abarcar continentes e incluso toda la biosfera debido al cambio climático global (Newman et al., 2008).

Existe una influencia de las ciudades sobre la temperatura del aire regional. Este conocido Efecto Isla de Calentamiento Urbano, indica que las temperaturas en las ciudades suelen ser más altas que las de la región rural / suburbana circundante porque las estructuras y materiales que componen la ciudad capturan más eficazmente el calor que los del campo circundante. Una celda advectiva epifenomenal puede ser creada cuando el aire más cálido se eleva sobre la ciudad, se enfría y, finalmente, vuelve a la superficie del terreno e ingresa nuevamente a la ciudad. Los contaminantes como las partículas tienden a ser retenidos en zonas urbanas por esta celda de circulación. Se han monitoreado condiciones térmicas elevadas alrededor de grandes ciudades como la ciudad de Nueva York (Bornstein, 1968), ciudades de Quebec (Oke, 1973) y en las grandes megaciudades de China (Wang et al. 1990; Li et al. 2004).

El calentamiento de la atmósfera urbana local puede contribuir también a la contaminación térmica en cuerpos de agua que reciben escorrentía de superficies pavimentadas (Herb et al. 2008). Descargas térmicas en la hidrosfera han ocurrido a partir de reactores de energía nuclear y de producción. Las elevadas temperaturas desplazan los equilibrios químicos (ej., sistema buffer de carbonatos), concentraciones de gases disueltos (ej., concentraciones de oxígeno disuelto) y transformaciones biogeoquímicas (ej., transformación de nitrógeno). Ellos también pueden impactar negativamente en la bioenergética de organismos individuales, relaciones entre los hospedadores y sus patógenos, y también en las relaciones entre los miembros de las comunidades de ambientes acuáticos.

Fuentes de contaminación

Los contaminantes son emitidos por las fuentes de emisión que pueden ser naturales o artificiales. Las fuentes artificiales a su vez pueden ser estacionarias o fijas (por ej. industrias) o móviles (por ej. tráfico vehicular). Una vez que los diferentes contaminantes alcanzan al medio (aire, agua, suelo), sufren una serie de procesos, como transporte y dispersión, como así también reacciones químicas. Finalmente, los contaminantes alcanzan los receptores (biota) a través de diversos mecanismos (precipitación, escorrentía, cadena alimenticia, entre otros) provocando diversos efectos en ellos.

Fuente puntual

El término "fuente puntual", según la Clean Water Act (EPA, 2015), se refiere a cualquier contaminante que ingresa al medio ambiente a través de una emisión discernible, confinada y discreta, la cual incluye pero no limita, a cualquier tubería, zanja, canal, túnel, conducto, pozo, fisura discreta, contenedores, material rodante, cría intensiva de ganado y otros de donde los contaminantes son o pueden ser descargados.

Las fábricas y las centrales eléctricas pueden ser una fuente de contaminación de origen puntual, que afecta tanto al aire como al agua. Las chimeneas pueden arrojar monóxido de carbono, metales pesados, dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno o "material particulado" (partículas pequeñas) al aire. Las refinerías de petróleo, las fábricas de papel y las plantas de automóviles que utilizan agua como parte de sus procesos de fabricación pueden descargar efluentes (aguas residuales que contienen contaminantes químicos nocivos) en ríos, lagos o el océano.

Las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales son otra fuente común de contaminación de origen puntual. El efluente de una planta de tratamiento puede introducir nutrientes y microbios dañinos en las vías fluviales. Los nutrientes pueden provocar un crecimiento desenfrenado de algas en el agua.



Figura 2.21: Ejemplos de fuentes puntuales (vertido de efluentes) y difusas (basurales, alcantarillados) de contaminación de las aguas superficiales.

Fuente difusa

La contaminación a través de “fuente difusa” es lo opuesto a la contaminación de fuente puntual, y los contaminantes se liberan en un área amplia. Como ejemplo, se puede mencionar el efecto de una tormenta eléctrica sobre una calle de la ciudad. A medida que el agua de lluvia fluye sobre el asfalto, arrastra las gotas de aceite que se filtraron de los motores de los automóviles, las partículas de goma de los neumáticos, los desechos de los perros y la basura. La escorrentía va a una alcantarilla pluvial y termina en un río, arroyo cercano y finalmente en el mar. La escorrentía es una de las principales causas de contaminación por fuentes difusas.

En las zonas rurales, la escorrentía puede lavar los sedimentos de los caminos, rutas, senderos, en un tramo forestal talado. También puede transportar ácido de minas abandonadas y eliminar plaguicidas y fertilizantes de los campos agrícolas. Toda esta contaminación terminará en cuerpos de agua dulce cercanos tales como arroyos, ríos y lagos, o en el mar. Asimismo la aplicación de agroquímicos con la consecuente posible deriva atmosférica se considera una fuente difusa de contaminación.

Los contaminantes atmosféricos son los principales contribuyentes a la lluvia ácida. Se forman en la atmósfera cuando el dióxido de azufre y los óxidos de nitrógeno se combinan con el agua. Debido a que la lluvia ácida es el resultado del movimiento a largo plazo de esos contaminantes provenientes de fábricas y plantas de energía, se considera contaminación de fuente difusa.



Figura 2.22: Ejemplos fuentes puntuales (chimeneas) y difusas (pulverizaciones, escapes de automóviles) de contaminación atmosférica.

Distribución y destino

El comportamiento de los contaminantes en el ambiente depende de las características físicas y químicas de los compuestos, tales como la [densidad](#), solubilidad, polaridad, y de las características del medio como factores climatológicos ([temperatura](#), vientos, humedad y precipitaciones), tipo de suelo (permeabilidad, [estructura](#), tamaño de partículas, contenido de humedad y de materia orgánica), presencia o no de cobertura vegetal. Una vez que alcanzan el suelo, los contaminantes pueden sufrir diferentes procesos de transformación y transporte como adsorción, hidrólisis, fotólisis, envejecimiento, transformación [química](#) y biológica, lixiviación, escorrentía, volatilización. Dichos procesos de transporte permiten que los contaminantes alcancen los cuerpos de agua superficial como lagunas, arroyos, lagos y ríos.

En la Tabla 2.1 se enumeran propiedades de las sustancias químicas de importancia para predecir su comportamiento ambiental se encuentran

Tabla 2.1. Propiedades de los contaminantes

Estructura y peso molecular
Solubilidad
Presión de vapor
Constante de Henry
Partición octanol/agua
Constante de adsorción a sólidos
Constante ácido base
Coefficiente de actividad
Constante de complejación
Constante redox
Constante de polimerización
Coefficiente de difusión
Espectro de absorción de luz
Factor de bioconcentración
Constante de hidrólisis
Tamaño de partícula

Las vinculadas con la estructura molecular suelen ser de gran utilidad para el desarrollo de los modelos de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) que permiten predecir la reactividad y actividad biológica de una molécula. Por otra parte, constantes como la de Henry (H), que vincula la solubilidad, S (mol m^{-3}), y la presión de vapor, P_v (atm), de una sustancia según la ecuación:

$$H = \frac{P_v}{S}$$

Permite predecir en que compartimiento ambiental tenderá a encontrarse en mayor medida dicho contaminante. En la [Figura 2.22](#) se muestra un ejemplo de tres sustancias con diferentes relaciones entre la solubilidad y la presión de vapor y cuál sería el compartimiento ambiental en el que se esperaría encontrarlas. Valores de $H < 3 \cdot 10^{-7}$ indican sustancias con una volatilidad menor a la del agua, entre $3 \cdot 10^{-7}$ y 10^{-5} sustancias poco volátiles, entre 10^{-5} y 10^{-3} son consideradas volátiles y $>10^{-3}$ muy volátiles.

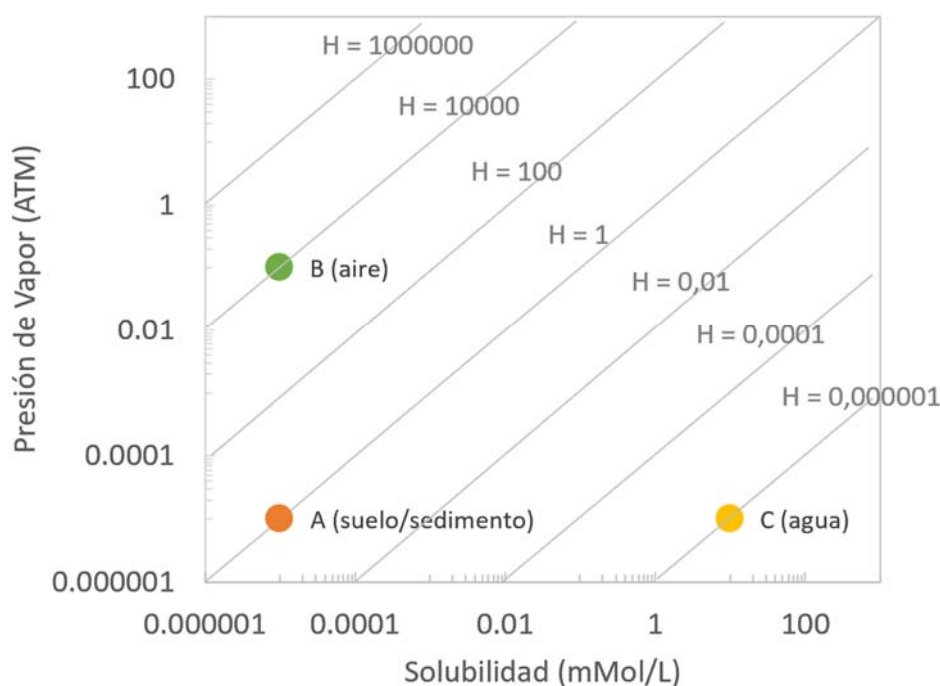


Figura 2.23. Relación entre la solubilidad y la presión de vapor de tres sustancias hipotéticas y el compartimiento ambiental donde se esperaría encontrarlas con mayor probabilidad.

Otras constantes de gran utilidad para determinar el destino de los contaminantes son la constante de partición octanol agua (K_{ow}) y la constante de partición carbono orgánico agua (K_{oc}) que indican la lipofilidad y la afinidad por la materia orgánica, respectivamente, y que para contaminantes orgánicos neutros permiten estimar su capacidad de bioacumularse o de sorberse sobre partículas con diferentes porcentajes de materia orgánica tanto en el suelo, sedimentos, y material en suspensión en ambientes acuáticos o en la atmósfera. Sustancias con valores de $\log K_{ow}$ entre 5 y 6 suelen considerarse bioacumulables. Por ejemplo, los hidrocarburos alifáticos halogenados suelen presentar valores de $\log K_{ow}$ entre 1 y 3, los hidrocarburos aromáticos entre 3 y 5 y los PCBs entre 4 y 10. Por otro lado, los $\log K_{oc}$ de plaguicidas como el 2,4D, la atrazina, glifosato y cipermetrina son estimadas en 1,2, 2,2, 3,4 y 6,6, respectivamente, mostrando la ma-

por afinidad del insecticida por la materia orgánica que generalmente queda retenido en los sedimentos mientras que los herbicidas 2,4D y atrazina, tendrán relativamente mayor afinidad por la fase acuosa y tendrán mayor capacidad de movilizarse.

Para los contaminantes orgánicos cargados, una constante importante es la de disociación ácido-base (pK_a), que es el pH al cual la especie ionizada y no ionizada se encuentran en la misma concentración. Muchos plaguicidas y contaminantes emergentes como los productos farmacéuticos son sustancias cuyo estado de ionización depende el pH del medio y algunos de ellos, como el glifosato o el sildenafil (Figura 2.24), poseen más de un grupo funcional que puede ionizarse y por tanto más de un pK_a .

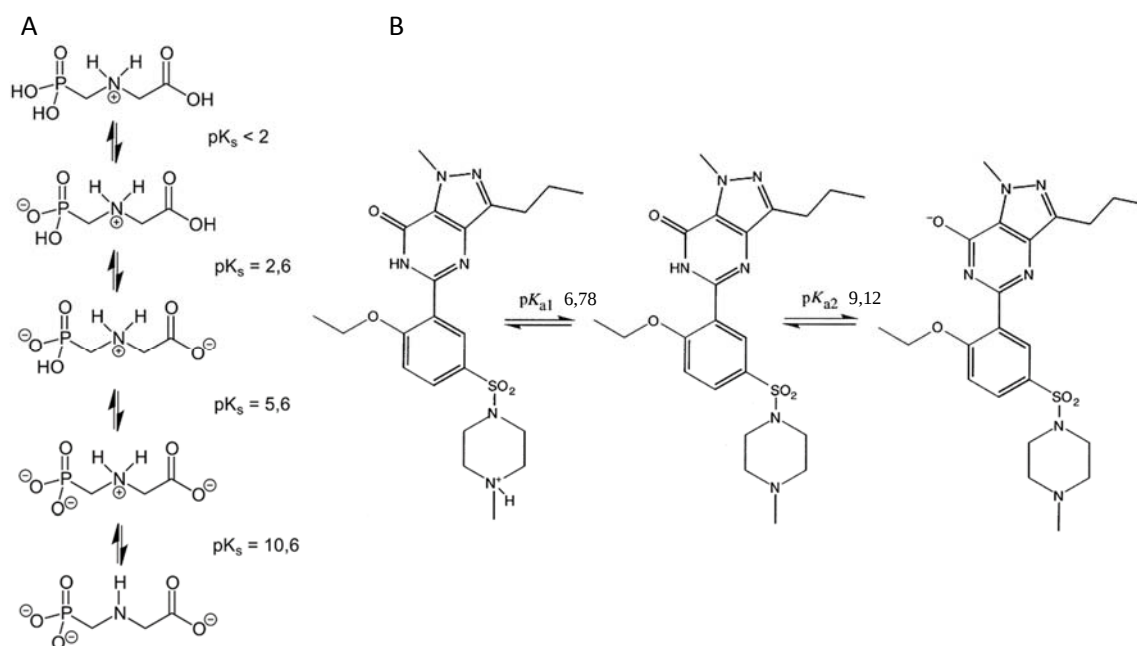


Figura 2.24. Ejemplos de sustancias orgánicas ionizables en función del pH que poseen más de un valor de pK_a , como el herbicida glifosato (A) y el fármaco sildenafil (B).

Además de las propiedades fisicoquímicas de las sustancias, también son importantes las características físicas (superficie, profundidad, flujos, tasas de sedimentación, irradiación, etc.), químicas (temperatura, pH, potencial redox, dureza, salinidad, materia orgánica, etc.) y biológicas (actividad microbológica, estado trófico, productividad, etc.) del ambiente. Así por ejemplo, en los ambiente más cálidos las actividades microbológicas son más activas y por tanto la degradación de los contaminantes más rápida que en ambientes fríos.

Tabla 2.2. Principales procesos ambientales que determinan la distribución y destino de los contaminantes

Transferencia de fases		
		Disolución <--> precipitación
		Adsorción <--> desorción
		Volatilización <--> deposición
Transporte		
		Dispersión y transporte en masas (advección)
		Sedimentación
		Difusión
		Enterramiento
Transformación		
	Abiótica	
		Hidrólisis
		Fotólisis
		Disociación
		Oxidoreducción
	Biótica	
		Biodegradación aeróbica
		Biodegradación anaeróbica

Finalmente, los procesos que determinan la distribución y destino de los contaminantes en el ambiente pueden dividirse en procesos de transferencia de fases, procesos de transporte y procesos de transformación. En la [Tabla 2.2.](#) se enumeran los procesos más relevantes y en la [Figura 2.25](#) se observan los principales [procesos](#) de transferencia de fases (ej. volatilización precipitación, etc.) de transporte (ej. advección, lixiviación) y transformación (ej. fotólisis, hidrólisis, biotransformación, etc.) que ocurren con la dinámica de los contaminantes en el ambiente.

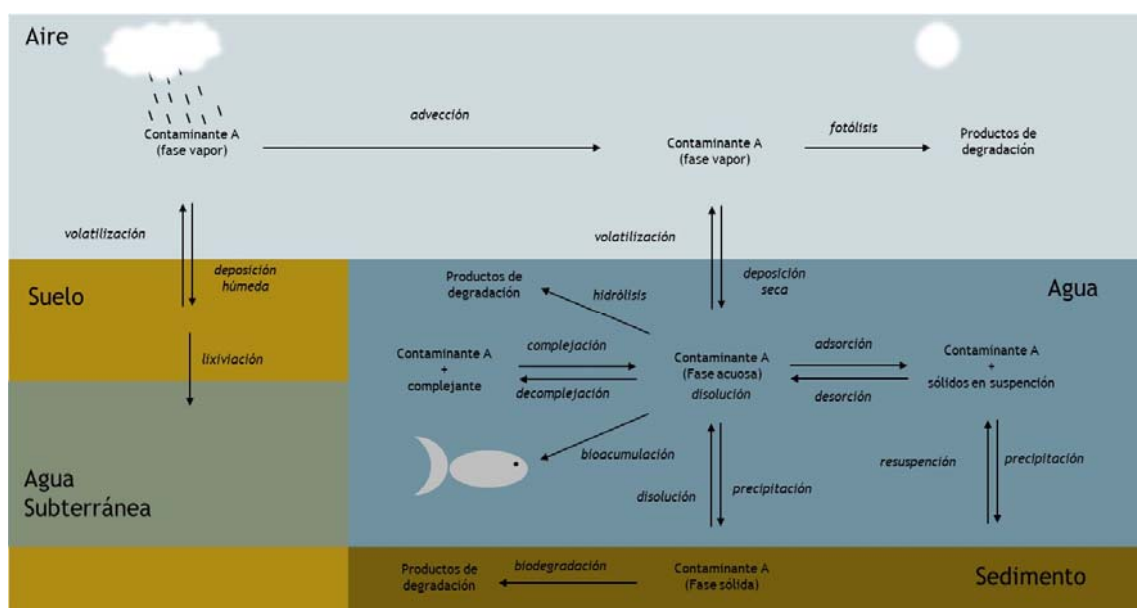


Figura 2.25: Procesos de transferencia de fases, transporte y transformación que condicionan la distribución y destino de los contaminantes en los diferentes compartimientos ambientales (atmosférico, terrestre, acuático).

Dentro de los diferentes procesos que gobiernan el destino de contaminantes en el ambiente, a continuación, se describen algunos de ellos, otros serán explicados en los capítulos siguientes:

Sorción: Es el proceso por el cual un compuesto en solución interacciona con un sólido. Incluye la adsorción, el cual es un proceso físico en donde existe una retención del soluto sobre la superficie de un material sólido. Por otro lado, el proceso de absorción, se refiere a la retención del soluto (contaminante) dentro del sólido, con difusión de masas entre fases. La sorción de un contaminante en suelo o sedimentos restringe su movilidad hacia el agua subterránea y su disponibilidad para ser asimilado por los organismos.

Lixiviación: Este proceso involucra el [movimiento](#) de un compuesto químico hacia capas profundas a través del suelo o sedimentos, pudiendo alcanzar el agua subterránea.

Volatilización: Es el proceso por el cual existe un cambio físico de una fase líquida o sólida a una fase gaseosa. Este hecho implica la posibilidad que los contaminantes alcancen la atmosfera y puedan transportarse a través de ella. La [presión](#) de vapor es uno de los factores más importantes que determina la volatilización. Las emisiones atmosféricas contribuyen a la contaminación de diferentes ecosistemas a través de deposición seca (contaminantes adsorbidos a partículas) o deposición húmeda (lluvias).

Descomposición química: Proceso por el cual los contaminantes pueden degradarse en el suelo, sedimentos, o adsorbidos a la biota. Existen en general seis reacciones (abióticas) que pueden ocurrir: hidrólisis, fotólisis, sustitución, eliminación, oxidación y reducción.

Bibliografía

- Albers, P.H., Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons, in Handbook of Ecotoxicology, D.J. Hoffman, B.A. Rattner, G.A. Burton, Jr., and J. Vairns, Jr., Eds., Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 2003
- Bornstein, R.D., Observations of the urban heat island effect in New York City. *J. Appl. Meteorol.*, 7, 575–582, 1968.
- Boxall, A.B.A., D.W. Kolpin, B. Halling-Sorensen, and J. Tools, Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environ. Sci. Technol.*, 287A–294A, 2003.
- Bunce, N., Environmental Chemistry, Wuerz Publishing, Winnipeg, Canada, 1991
- Dicks, L., Bees, lies, and evidence-based policy. *Nature*, 494, 283, 2013
- EFSA (European Food Safety Authority), Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin. *EFSA J.*, 11, 3066, 58 p., 2013a, Available at www.efsa.europa.eu/efsajournal.
- EFSA (European Food Safety Authority), Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid. *EFSA J.*, 11, 3068, 55 p., 2013b, Available at www.efsa.europa.eu/efsajournal.
- EFSA (European Food Safety Authority), Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam. *EFSA J.*, 11, 3067, 68 p., 2013c, Available at www.efsa.europa.eu/efsajournal.
- Giesy, J.P. and K. Kannan, Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 1339–1342, 2001.
- Giesy, J.P. and K. Kannan, Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 1339–1342, 2002.
- Herb, W.R., B. Janke, O. Mohseni, and H.G. Stefan, Thermal pollution of streams by runoff from paved surfaces. *Hydrol. Process*, 22, 987–999, 2008
- Ju-Nam, Y. and J.R. Lead, Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci. Total Environ.*, 400, 396–414, 2008.
- Kagabu, S., Chloronicotiny insecticides: Discovery, application and future perspective. *Rev. Toxicol.*, 1, 75–129, 1997
- Kennish, M.J., Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997
- Key, B.D., R.D. Howell, and C.S. Criddle, Fluorinated organics in the biosphere. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 2445–2454, 1997.
- Kimura-Kuoda, J., Y. Komuta, Y. Kuroda, M. Hayashi, and H. Kawano, Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *PLoS ONE*, 7, e32432 (1–11), 2012.
- Li, Q., H. Zhang, X. Liu, and J. Huang, Urban heat island effect on annual mean temperature during the last 50 years in China. *Theor. Appl. Climatol.* 79, 165–174, 2004.
- Manahan, S.E., Fundamentals of Environmental Chemistry, Lewis Publishers, Chelsea, MI, 1993.

- Manahan, S. E., *Fundamentals of Environmental Chemistry*, Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton, FL, 2000.
- Moody, C.A. and J.A. Field, Perfluorinated surfactants and the environmental implications of their use in firefighting foams. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 3864–3870, 2000.
- Newman, M. C. and W. H. Clements, *Ecotoxicology: A Comprehensive Treatment*, Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.
- Oberdörster, G., V. Stone, and K. Donalson, Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*, 1, 2–25, 2007.
- Oke, T.R., City size and the urban heat island. *Atmos. Environ.*, 7, 769–779, 1973.
- Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) 1992- Consecuencias sanitarias del empleo de Plaguicidas en la Agricultura. Ginebra. Suiza – 128 pp
- Peralta-Videa, J.R., L. Zhao, M.L. Lopez-Moreno, G. de la Rosa, J. Hong, and J.L. Gardea-Torresdey, Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008–2010. *J. Hazard. Mater.*, 186, 1–15, 2011.
- Pawlowski, S., A. Sauer, J.A. Shears, C.R. Tyler, and T. Braunbeck, Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17 α -methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquat. Toxicol.*, 68, 277–291, 2004.
- Tomizawa, M. and J.E. Casida, Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. *Ann. Rev. Pharmacol.*, 45, 247–268, 2005.
- UNEP, Regionally Based Assessment of Persistent Toxic Substances. Global Report. UNEP Chemicals, Geneva, 207 p, 2003.
- UNEP, The 9 new POPs. An introduction to the nine chemicals added to the Stockholm Convention by the Conference of the Parties at its fourth meeting, UNEP Chemical, 15 p, 2010.
- Verreault, J., U. Berger, and G.W. Gabrielsen, Trends in perfluorinated alkyl substances in Herring gull eggs from two coastal colonies in northern Norway: 1983–2003. *Environ. Sci. Technol.*, 41, 6671–6677, 2007.
- Wang, W.C., Z. Zeng, and T.R. Karl, Urban heat islands in China. *Geophys. Res. Lett.*, 17, 2377–2380, 1990

CAPÍTULO 3

Biodisponibilidad, bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación de los contaminantes

Pedro Carriquiriborde

En el capítulo previo, se han identificado las principales familias de contaminantes ambientales y los factores que determinan su distribución y destino en el ambiente. Una vez en él, dichos contaminantes pueden ser incorporados por los seres vivos, acumularse y alcanzar concentraciones internas en sitios blanco desencadenando así su acción tóxica. Según McCarty (1990), la toxicidad de un contaminante es la resultante de tres fases de acción (Figura 3.1.). Una primera fase de **exposición**, dada por los factores físicos químicos y biológicos que determinan su biodisponibilidad, o sea, en que grado un contaminante puede ser incorporado por el organismo. Luego una segunda fase de **partición**, dada por los factores que condicionan la absorción, distribución, metabolización y excreción, que determina la toxicocinética y por tanto la bioacumulación del contaminante. Finalmente, una tercera fase de **potencia**, dada por la concentración interna del contaminante que, según su mecanismo de acción, interaccionará con las biomoléculas en el sitio blanco, y sumado a los mecanismos de reparación/compensación que posea el organismo, determinará la toxicodinámica y consecuentemente la toxicidad del contaminante.

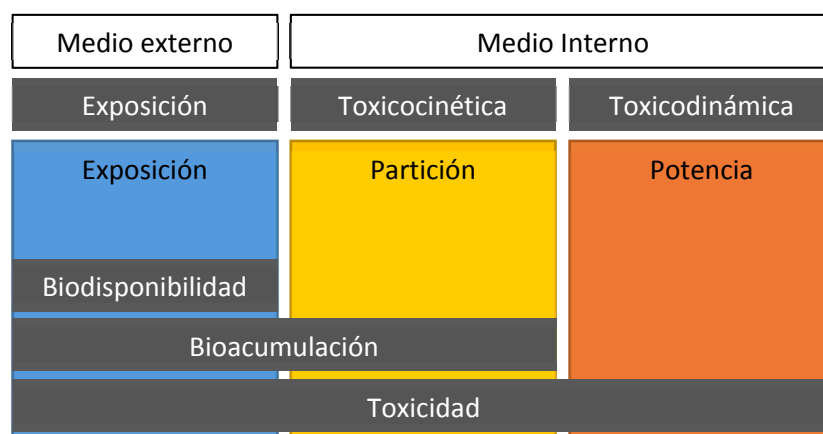


Figura 3.1: Las tres fases de la acción tóxica propuesta por McCarty (1990)

En el presente capítulo se tratarán las dos primeras fases, identificando los principales factores que afectan la incorporación y los procesos que determinan la acumulación de los contaminantes en los seres vivos y en los próximos capítulos se tratarán los efectos tóxicos que inducen.

Factores ambientales que condicionan la acumulación de los contaminantes en la biota

Una vez que los contaminantes ingresan al ambiente y se distribuyen en los diferentes compartimientos ambientales, no todas las moléculas del mismo allí presentes son capaces de ingresar a los organismos y producir efectos adversos. Por consiguiente, se define como **biodisponibilidad ambiental** a la proporción del total de la masa de un contaminante hallada en un compartimiento ambiental que se encuentra en una forma química (biodisponible) capaz de ser absorbida por los organismos vivos y producir un efecto biológico adverso. Este concepto puede diferenciarse del concepto de **biodisponibilidad farmacológica** al cual se refiere a la proporción de la dosis administrada que alcanza su sitio blanco dentro del organismo.

Como fuera mencionado en el capítulo anterior, en todos los compartimientos ambientales se pueden encontrar las cuatro fases: sólida, acuosa, gaseosa y biota, por tanto uno de los factores que influirá sobre la biodisponibilidad de los contaminantes es su afinidad diferencial por cada una de las diferentes fases, y que puede ser descrito por las constantes de reparto entre cada fase o alternativamente por su fugacidad. Los factores que determinan la biodisponibilidad ambiental de una sustancia difieren si se trata de compuestos orgánicos o inorgánicos.

La biodisponibilidad de los **metales y metaloides** desde la fase acuosa se ven afectados por las características fisicoquímica del agua. El pH es un factor muy importante que modifica el equilibrio químico entre diferentes especies químicas de sustancias como el amonio ($\text{NH}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$) y el cianuro ($\text{H}^+ + \text{CN}^- \leftrightarrow \text{HCN}$), afectando así su biodisponibilidad ya que la especie neutra es la que atraviesa con mayor facilidad las membranas. La biodisponibilidad de los metales y metaloides también son afectados por la especiación química. Los cationes metálicos compiten por otros cationes por ligandos disueltos, es decir aniones con los que pueden formar compuestos de coordinación o complejos. Tales ligandos pueden ser orgánicos o inorgánicos. Entre los orgánicos se encuentra la materia orgánica disuelta natural conformada por los ácidos húmicos y fúlvicos, que poseen una amplia variedad de grupos funcionales tales como ácidos carboxílicos y fenólicos. Entre los ligandos inorgánicos relevantes en agua salada, se pueden enumerar el: BOH , BOH_4^- , Cl^- , CO_3^{2-} , HCO_3^- , F^- , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , NH_3 , OH^- , $\text{Si}(\text{OH})_4$ y SO_4^{2-} . En agua dulce, los ligandos inorgánicos más relevantes son: Cl^- , CO_3^{2-} , HCO_3^- , F^- , OH^- y SO_4^{2-} . En condiciones anóxicas también resultan importantes el NH_3 , HS^- , S^{2-} . El agua también es un importante ligando que forma esferas de hidratación alrededor de los cationes metálicos.

Es posible calcular el equilibrio termodinámico de las diferentes especies de un catión metálico en función del pH, Eh, concentración de diferentes ligandos, temperatura y fuerza iónica del medio. De tal forma se puede utilizar la concentración del catión libre estimada para normalizar

la concentración de un metal en cuerpos de agua con diferentes características fisicoquímicas. Ello es importante dado que la biodisponibilidad, y por ende la toxicidad, de un metal correlaciona con la concentración del catión libre y ha dado origen al “**modelo de actividad del ion libre**” (FIAM). Sin embargo, no siempre el catión libre es la especie que posee mayor biodisponibilidad. Algunos complejos de metales de la clase B (ej. HgCl_2) pueden ser más lipofílicos que el catión (Hg^{+2}) y tales complejos neutros del cloro en ambientes marinos pueden incrementar la biodisponibilidad del metal. Los metales del grupo del platino (Pt, Pd, Rh), de importancia ambiental por su utilización en los catalizadores de los autos, pueden formar complejos con ligandos orgánicos que incrementan su biodisponibilidad.

La fisicoquímica del agua también afecta la competencia entre cationes por los sitios de unión en las membranas modificando la biodisponibilidad. Cationes monovalentes como Ag^+ compiten con H^+ por los sitios de unión en las superficies biológicas. En el caso del Cu^{+2} , por su radio iónico semejante, compite particularmente con el Na^+ . Por otro lado, los cationes bivalentes como el Cd competirán con el Ca^{+2} y el Mg^{+2} , por consiguiente, la dureza del agua es un parámetro importante para predecir su biodisponibilidad.

La microcapa estancada que recubre las superficies biológicas posee un papel muy importante ya que puede modificar drásticamente la fisicoquímica del medio más próximo a la membrana. La excreción de NH_4^+ , NH_3 , HCO_3^- y CO_2 desde las superficies respiratorias puede modificar rápidamente las condiciones del medio que fluye sobre la membrana.

En el caso de los **compuestos orgánicos**, la biodisponibilidad desde la fase acuosa puede ser predicha de forma cuantitativa en función de las relaciones estructura-actividad cuantitativa (QSARs) que utiliza parámetros moleculares para predecir actividades biológicas tales como la biodisponibilidad y toxicidad.

Sin embargo, en ecotoxicología, la biodisponibilidad de un compuesto orgánicos se estima más comúnmente mediante la constante de reparto octanol/agua, K_{ow} . En esta aproximación simple, el organismo es considerado como una esfera lipídica recubierta por una bicapa lipídica y se considera que el contaminante ingresa y sale por difusión pasiva alcanzándose, en un tiempo dado, un equilibrio termodinámico entre las ambas fases. La constante se obtiene a partir de un reparto líquido/líquido de acuerdo a la solubilidad diferencial del soluto en el octanol y el agua. La expresión matemática de dicha relación está dada como:

$$K_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{agua}}$$

En términos de la fugacidad (f), “tendencia de escape”, de cada sustancia, cuando se alcance tal equilibrio, por definición, éstas serán iguales para ambas fases según:

$$f_{octanol} = f_{agua}$$

La fugacidad se encuentra relacionada con la concentración (C ; mol/m^3) de la sustancia en la fase a través de la capacidad de fugacidad (Z ; $\text{mol}/\text{m}^3 \times Pa$) de acuerdo a la expresión:

$$Z_i \times f_i = C_i$$

Por consiguiente, dada la fugacidad de ambas fases en el equilibrio termodinámico, se puede relacionar K_{ow} tanto con las concentraciones y las capacidades de fugacidad de ambas fases según la ecuación:

$$K_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{agua}} = \frac{Z_{octanol}}{Z_{agua}}$$

La constante de partición K_{ow} correlaciona linealmente con la acumulación de contaminantes orgánicos que poseen valores de $\log K_{ow}$ entre 3 y 6. Sin embargo, la predicción no es buena para compuestos con $\log K_{ow} < 3$ o > 6 . En el primer caso se debe a que las membranas imponen una restricción para la incorporación y eliminación de sustancias más hidrofílicas disminuyendo su acumulación respecto a la predicha por el K_{ow} . En el otro extremo, las sustancias superhidrofóbicas, suelen además poseer un tamaño molecular demasiado grande que por un lado reduce su difusión a través de las membranas y por otro su solubilidad en los lípidos se desvía de la predicha por el K_{ow} . En la [Figura 3.2](#), se muestra la relación entre el logaritmo de la constante de incorporación ($\log K_u$) y eliminación ($\log K_e^{-1}$) y el factor de bioacumulación con el $\log K_{ow}$.

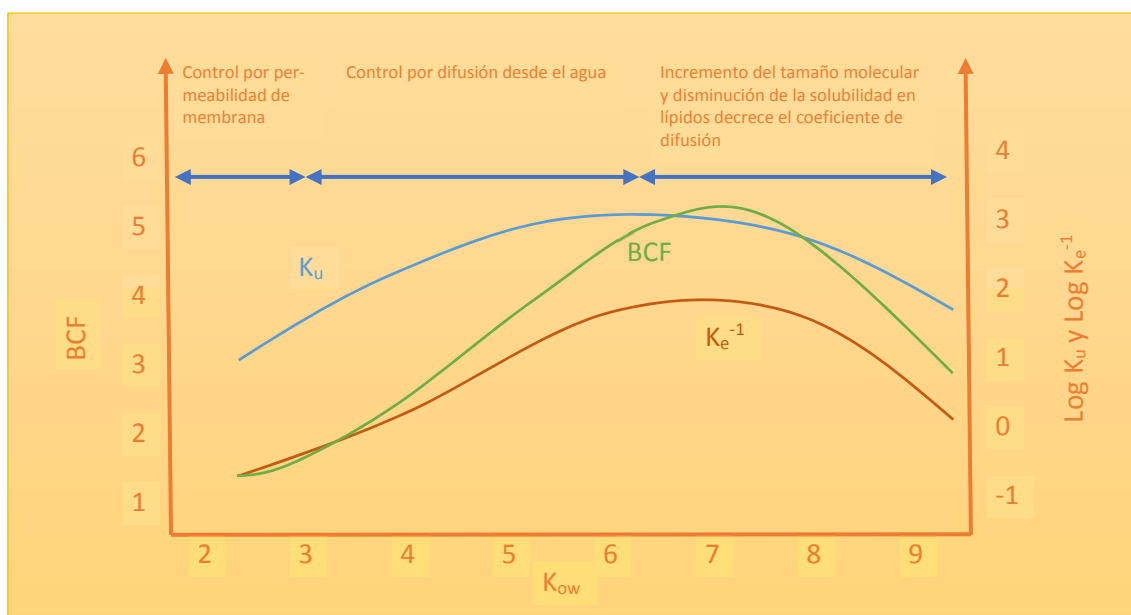


Figura 3.2: Relación entre el K_{ow} y el factor de bioconcentración y constantes de incorporación y eliminación

En el caso de la biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos desde el agua resulta también importante considerar si los mismo son ionizables o no ya que el pH del medio puede modificar su estado de ionización y por consiguiente su biodisponibilidad, dado que, de acuerdo con la “hipótesis de partición-pH” la mayor biodisponibilidad está dada por la difusión de la especie no ionizada a través de la membrana. Recordemos que el pK_a se define como $-\log$ de la constante de ionización (K_a) para un ácido débil de Brønsted calculada como:

$$K_a = \frac{[H^{=+}] \times [X^-]}{[HX]}$$

A su vez, la proporción de un ácido monobásico y una base monoácida puede estimarse según la relación de Henderson-Hasselbalch de acuerdo a las siguientes expresiones, respectivamente:

$$f_u = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}}$$

$$f_u = \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}}$$

Sin embargo, en algunos casos la especie ionizada también puede contribuir a la biodisponibilidad total del contaminante orgánico, y desde ya, la hipótesis de partición-pH no es válida para aquellos contaminantes que son incorporados a través de transportadores específicos.

En los ambientes acuáticos, no sólo es de relevancia la fase acuosa, sino también el material particulado en suspensión que puede afectar drásticamente la biodisponibilidad de los contaminantes. Dado que en general se asume que la fracción soluble del contaminante es la que posee mayor biodisponibilidad, una aproximación para estimar dicha fracción es mediante la constante de reparto entre la fase sólida (partícula) y la fase acuosa (K_{pw}) según la expresión:

$$K_{pw} = \frac{C_p}{C_w}$$

Donde, C_p es la concentración del contaminante adsorbido en la partícula y C_w la concentración del mismo en el agua. Para el caso de los contaminantes orgánicos, resulta particularmente relevante el contenido de carbono orgánico que compone la partícula y la constante de reparto carbono orgánico agua (K_{oc}) que posea el contaminante, calculada como:

$$K_{oc} = \frac{C_{oc}}{C_w}$$

Donde, C_{oc} es la concentración del contaminante en la fase carbono orgánico y C_w en la fase acuosa. La partición basada en el carbono orgánico resulta un buen estimador de la cantidad de contaminante adsorbido a partículas naturales. Dado que las concentraciones de los contaminantes son típicamente bajas, la relación entre la concentración del mismo y la adsorción al carbono orgánico puede considerarse lineal. A diferencia del K_{ow} , el K_{oc} puede variar con la naturaleza de la materia orgánica. Sin embargo, ambas constantes pueden ser relacionadas, de forma general, mediante la ecuación:

$$K_{oc} = \frac{K_{ow}}{d_{oc}}$$

Donde, d_{oc} es la densidad del carbono orgánico. Por tanto, para partículas con una fracción de carbono orgánico dada por f_{oc} y una densidad aproximadamente de 1, la constante de partición partícula/agua puede expresarse como:

$$K_{pw} = \frac{C_p}{C_w} = f_{oc} \times K_{oc} = f_{oc} \times K_{ow}$$

Resulta importante poder conocer cuál es la fracción disuelta del total de un contaminante presente en un ambiente acuático. Si consideramos que:

$$C_{tot} = C_w + C_p$$

Por tanto, si se reemplaza C_p por $C_w \times K_{pw}$ obtengo:

$$\frac{C_w}{C_{tot}} = \frac{1}{1 + K_{pw} \times X}$$

Donde X es la fracción volumétrica (Kg/L) de partículas, que típicamente posee un valor de 10^{-5} . Substituyendo ecuaciones se la fracción disuelta puede calcularse también como:

$$C_w = \frac{C_{tot}}{1 + f_{oc} \times K_{oc}}$$

En la [Figura 3.3](#) se muestra la relación entre los sólidos totales en suspensión (con un contenido de carbono orgánico del 10%) y la fracción disuelta para contaminantes con diferentes K_{oc} .

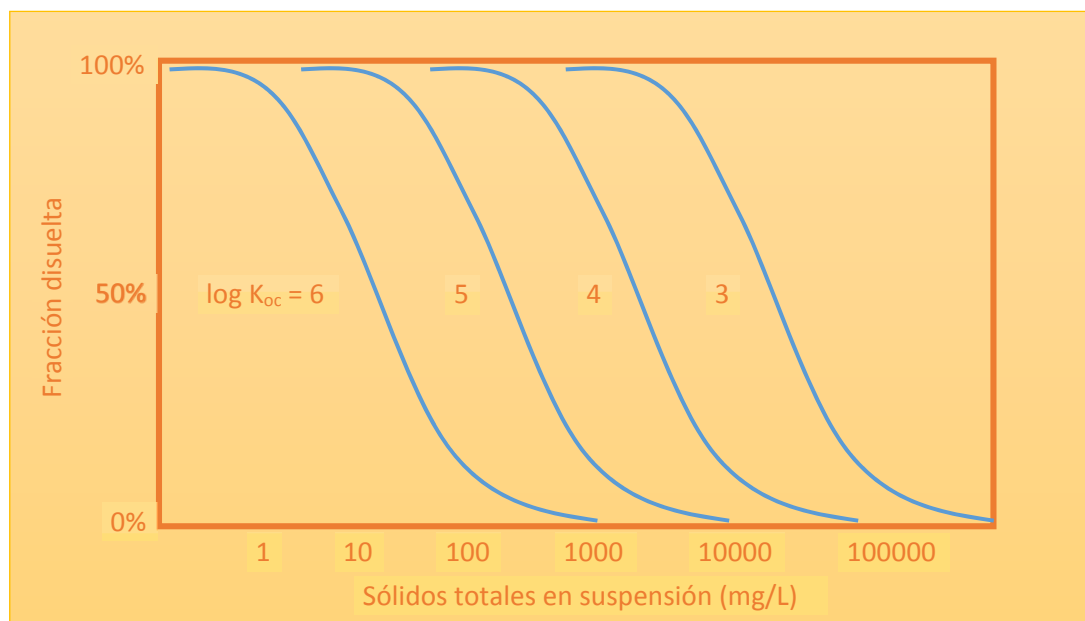


Figura 3.3: Relación entre la concentración de sólidos suspendidos en el agua y la fracción disuelta de contaminantes orgánicos con diferentes K_{oc} .

La biodisponibilidad de los contaminantes inorgánicos desde la fase sólida (aerosoles, alimentos, sedimentos, suelos, etc.) no es sencillo de predecir, aunque pueden mencionarse algunas consideraciones generales. La biodisponibilidad de los metales y metaloides desde aerosoles sólidos no sólo depende de su forma química, sino también del tamaño de las partículas sólidas. Por ejemplo, las partículas con diámetros menores a 1 μm pueden penetrar más profundamente en el sistema respiratorio llegando a depositarse en los bronquiolos, ductos alveolares y alveolos, mientras que partículas de mayor tamaño suelen quedar retenidas por los vellos nasales o en la región nasofaríngea. Se ha sugerido además que los contaminantes más hidrosolubles adsorbidos en las partículas tienden a ser más biodisponibles en el pulmón que los liposolubles. Los haluros de plomo generados en el escape del automóvil se disuelven más fácilmente en el pulmón que el sulfato de plomo adsorbido al polvo de la carretera. La distribución del contaminante en la partícula también es importante. El arsénico que se deposita sobre la superficie de las cenizas al salir por las chimeneas de las plantas termoeléctricas a carbón es más biodisponible que si estuviera distribuido homogéneamente en toda la partícula.

Estimar la biodisponibilidad de los contaminantes desde el alimento también es un tema complejo ya que depende de muchos factores. El porcentaje de asimilación de un contaminante en el alimento variará de acuerdo al tipo de alimento. Es conocido, por ejemplo, que el zinc se absorbe mejor desde las carnes que desde los cereales y deficiencias crónicas de zinc se han encontrado en poblaciones humanas de Medio Oriente con enanismo, donde no sólo la dieta es a base de cereales, sino que además se tiene la costumbre de ingerir arcilla que reduce aún más la biodisponibilidad intestinal del metal. La ingestión de municiones de plomo por las aves se ha transformado en un problema ambiental de relevancia en zonas de caza dado que la biodisponibilidad del plomo se incrementa en el estómago por el molido y disolución en el medio ácido. Para evaluar la eficiencia de la asimilación, o en otras palabras cuán biodisponible está un contaminante en diferentes alimentos, pueden realizarse estudios de laboratorio comparando la absorción del contaminante respecto a trazadores, como por ejemplo el Cr. Para ello el contaminante y el trazador se miden en el alimento y en las heces, asumiendo una asimilación despreciable del trazador. El tamaño y tipo de partícula sólida también juega un papel muy importante, por ejemplo, en organismos filtradores como los bivalvos dado que posee un sistema altamente selectivo y algunas partículas muy pequeña pueden ser incorporadas directamente como tales por los fagocitos presentes en las branquias.

La biodisponibilidad de los metales y metaloides desde el sedimento es difícil de estimar. En términos generales se asume la existencia de una relación entre la concentración del metal en el sedimento y en el agua intersticial y que ésta última es la que se encuentra biodisponible para los organismos bentónicos. Sin embargo, dicha relación no sólo depende de la concentración total del metal sino también de la naturaleza del sedimento que retendrá con mayor o menor fuerza al metal sobre su superficie y por tanto resulta más importante conocer la fracción extraíble del metal (ej. con HCL 1N). En sedimentos óxicos, los óxidos de hierro y el contenido de carbono orgánico reducen la biodisponibilidad de los metales. Mientras que en sedimentos anóxicos los sulfuros poseen un papel preponderante en la reducción de la biodisponibilidad de los

metales. Por consiguiente, desde el punto de vista ecotoxicológico, suele normalizarse la concentración total del metal respecto al hierro, carbono orgánico y sulfuros ácidos volátiles. Sin embargo, tales estimaciones deben considerarse cuidadosamente dado que no siempre las relaciones son sencillas. Además, hay organismos del bentos que no sólo están expuestos a los metales disueltos en el agua intersticial por vía dérmica, sino que suelen ingerir el propio sedimento y por tanto dichas normalizaciones pueden no resultar efectivas para estimar la biodisponibilidad. Para estos casos suele utilizarse una estrategia denominada biomimética que determina los metales extractables por un jugo gástrico sintético. Esta aproximación ha sido utilizada para estimar la toxicidad de metales en el suelo para los anélidos.

En el caso de la biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos desde el alimento, es importante considerar si los mismo son ionizables o no ya que el pH del jugo gástrico puede modificar su estado de ionización y por consiguiente su biodisponibilidad. Ello es particularmente relevante para aquellos compuestos con un pKa entre 2,5 y 7,5 ya que aquellos ácidos débiles con pKa mayores a 8 permanecerán siempre no ionizados a pHs gástricos. Sin embargo, al igual que lo mencionado para la biodisponibilidad desde la fase acuosa, en algunos casos la especie ionizada también puede contribuir a la biodisponibilidad total del contaminante orgánico y la hipótesis de partición-pH no sería válida para aquellos contaminantes que son incorporados a través de transportadores específicos.

Para el caso de los compuestos orgánicos no ionizables y lipofílicos, la biodisponibilidad puede vincularse con el Kow. Estudios con peces han mostrado que la mayor biodisponibilidad desde el alimento se observa para aquellos compuestos con un log Kow de 6. Sin embargo, si se considera la biodisponibilidad desde el suelo, compuestos como PCBs con log Kow entre 4 y 7 son adsorbidos fuertemente a las partículas edáficas y no se encuentran fácilmente biodisponibles para las plantas, mientras que pesticidas como los neonicotinoides, con Kow de entre 1 y 2, resultan más biodisponibles.

La “regla de cinco” de Lipinski es una regla empírica que ha sido desarrollada para estimar cuan asimilable puede ser en humanos, por consumo oral, un medicamento que no es susceptible de transporte activo. La regla resulta también útil para estimar la biodisponibilidad de contaminantes lipofílicos neutros desde la dieta. La misma establece que para que un compuesto sea biodisponible oralmente no debe violar más de una de las siguientes consideraciones:

1. poseer menos de cinco donadores de enlaces por puentes de hidrógeno (átomos de nitrógeno u oxígeno con al menos un átomo de hidrógeno).
2. poseer menos de diez aceptores de enlaces por puentes de hidrógeno (átomos de nitrógeno, oxígeno o flúor).
3. poseer un peso molecular < 500 uma.
4. poseer un log Kow < 5

La biodisponibilidad de contaminantes lipofílicos desde el sedimento para especies bentónicas usualmente suele decrecer al aumentar el Kow dado que en la partición partícula/agua intersticial

se reduce la concentración del contaminante en la fase acuosa. La biodisponibilidad decrece también al aumentar el contenido de carbono orgánico del sedimento y aumentar el K_{oc} del contaminante. Para compuestos organoclorados se ha observado que la mayor biodisponibilidad se encuentra para aquellas sustancias con un K_{ow} próximo a 6. Sin embargo, otros estudios indican que la lipofilicidad por sí sola no es suficiente para estimar la biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos desde el suelo, debiéndose considerar además el momento dipolar, el tamaño molecular y la configuración estructural.

Vías de exposición por las que pueden ingresar los contaminantes al organismo

En la primera fase de la acción tóxica, es importante primero identificar cuál o cuáles son las **vías de exposición** (Figura 3.4.) por las cuales el contaminante estará en contacto con el organismo e ingresará al mismo.

Uno de los eventos evolutivos que dieron origen a los organismos vivos en la tierra fue la aparición de una barrera que delimitara un medio interno donde ocurrieran reacciones metabólicas específicas e independientes del medio externo circundante. Tal barrera estuvo primeramente dada por una bicapa de fosfolípidos que dio origen a la actual membrana plasmática y que fue capaz de organizarse espontáneamente en vesículas huecas y autoselladas (liposomas). Luego, durante la evolución se sumaron otras estructuras como las paredes celulares de las bacterias, hongos y vegetales. Más tarde, con el origen de los organismos pluricelulares aparecieron sistemas de uniones intercelulares, particularmente importantes en los epitelios que recubren dichos organismos y que aíslan el medio interno del externo. En los animales la vía puede ser dérmica (por el epitelio de la piel o el tegumento), por vía respiratoria, epitelios de los pulmones o las branquias, o por vía digestiva (epitelio intestinal). En las plantas, las vías de exposición más frecuentes son la radicular (epitelio de las raíces) o la foliar (epitelio que recubre las hojas o por los estomas).

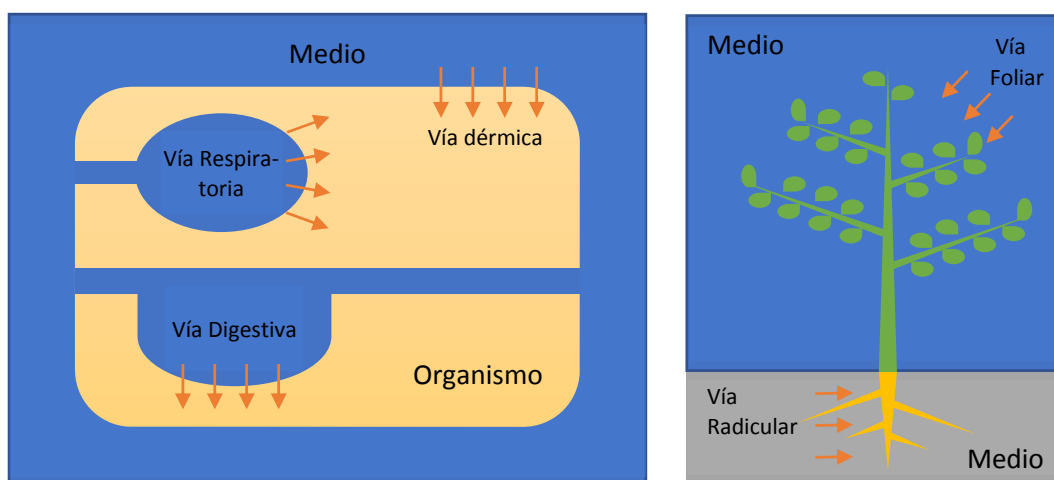


Figura 3.4: Posibles vías de exposición de los contaminantes para organismos animales y vegetales.

Incorporación de los contaminantes a través de las membranas biológicas

Por cualquiera de las vías mencionadas, los contaminantes que se encuentran en el ambiente para poder ingresar al interior de las células e interactuar con las moléculas blanco que determinan su acción tóxica deberán ser capaces de atravesar las barreras antes mencionadas. Si bien las paredes celulares pueden ser una barrera importante, suelen poseer poros que les confieren una permeabilidad selectiva menor que la de las membranas biológicas. Por tal motivo, comprender las propiedades de las sustancias que son capaces de atravesar las membranas plasmáticas y los sistemas de transporte que en ellas existen es de gran importancia a la hora de predecir la capacidad de diferentes contaminantes puedan o no ingresar al organismo ([Figura 3.5.](#)). Aquellos contaminantes hidrofóbicos, liposolubles y con K_{ow} altos, podrán atravesar libremente las membranas biológicas en favor del gradiente de concentración sin costo energético alguno por difusión simple. Dicha capacidad se irá reduciendo a medida aumente su polaridad, o sea, se trate de sustancias más hidrofílicas, hidrosolubles y con K_{ow} bajos, y aumente el tamaño de la molécula. Aquellos contaminantes que posean grupos químicos cargados a valores de pH ambientalmente relevantes, no podrán difundir libremente a través de las membranas biológicas, las cuales son impermeables a los iones. Aquellas moléculas polares, de gran tamaño o que se encuentren ionizadas sólo podrán atravesar las membranas asistidas por algún tipo de transporte mediado por proteínas de transporte o por vesículas que se formen por invaginación, o se fusionen con, la membrana plasmática por mecanismos de endocitosis y exocitosis, respectivamente. Los iones inorgánicos podrán moverse de un lado a otro a través de canales iónicos, dependientes, o no de voltaje, si lo hacen en favor del gradiente electroquímico, o a través de bombas iónicas impulsadas por ATP, si lo hacen en contra del gradiente electroquímico. Las moléculas orgánicas serán transportadas por difusión facilitada si lo hacen en favor del gradiente electroquímico a través de proteínas específicas o por transporte activo, si se mueven en contra del gradiente electroquímico utilizando proteínas que requieren de ATP u otra fuente que les provea de energía para ello. Los sistemas de transporte mencionados, pueden en algunos casos transportar simultáneamente dos sustancias (cotransporte) ya sea en el mismo sentido (simporte) o en sentidos opuestos (antiporte). En otros casos, varios transportadores pueden actuar simultáneamente conformando un sistema de transporte múltiple integrado. Algunos contaminantes podrán ser incorporados o eliminados por medio de endocitosis o exocitosis, mediante la invaginación de la membrana plasmática o la fusión de vesículas a la misma con gasto de energía.

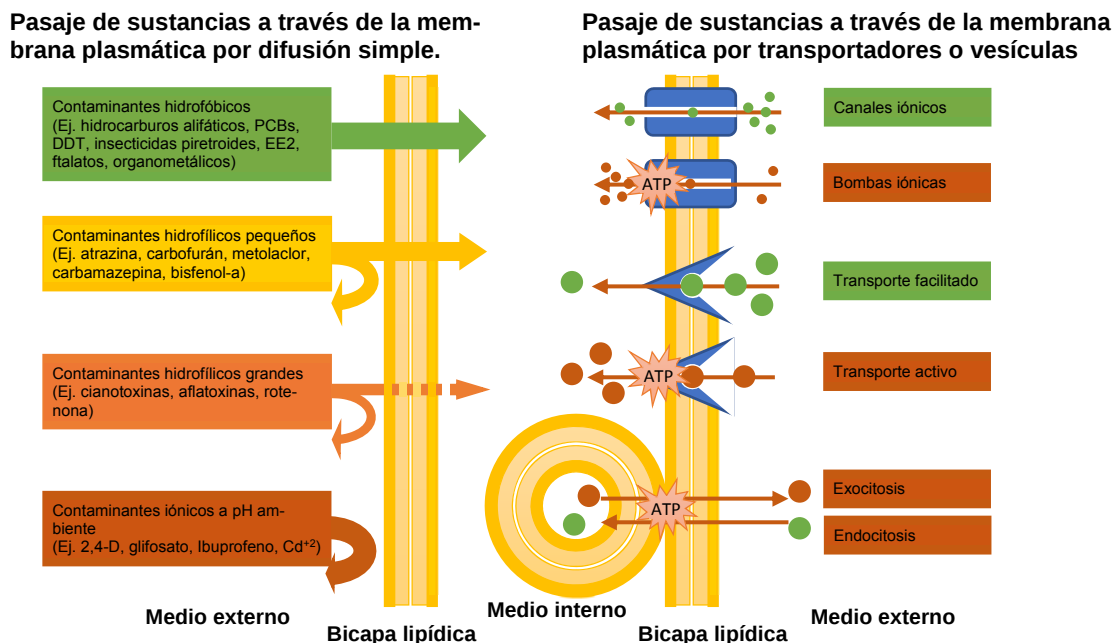


Figura 3.5: Mecanismos de ingreso y egreso de los contaminantes a través de la membrana plasmática.

Como ejemplos de canales iónicos pueden mencionarse los canales de sodio y calcio, que en las membranas plasmáticas de las branquias de los organismos acuáticos pueden ser utilizado por el Cu^+ o el Cd^{+2} , respectivamente, para ingresar a las células, provocando desbalances iónicos de Na^+ y Ca^{+2} en el plasma. Contaminantes polares o con cargas como muchos fármacos o plaguicidas, son incorporados o eliminados por transportadores específicos que se encuentran en las membranas de diferentes tejidos. Entre los transportadores más relevantes que contribuyen a la incorporación de moléculas orgánicas en mamíferos se encuentran el polipéptido de transporte de aniones orgánicos (oatp) hepático, el transportador de aniones orgánicos (oat) renal y los transportadores de cationes orgánicos (oct) hepático, renal y placentario. En el intestino son relevantes el transportador de nucleótidos (nt), el transportador de metales divalentes (dmt) y el transportador de péptidos. En la eliminación de moléculas orgánicas se pueden mencionar como relevantes la proteína de resistencia-multi-droga (mdr) o glicoproteína-p importante en la excreción biliar de xenobióticos en el hígado y reducción de absorción intestinal, en la barrera placentaria y sanguínea. Otro transportador de xenobióticos importante es la proteína de resistencia múltiple a drogas (mrp) que actúa en la excreción urinaria y hepática. Otros contaminantes como los PCBs, hidrocarburos aromáticos policíclicos o disruptores endócrinos como el EE_2 , pueden atravesar las membranas por difusión pasiva. Es posible identificar si una sustancia dada atraviesa las membranas por difusión o con la asistencia de un transportador por la relación entre la concentración del contaminante y la velocidad de ingreso. En aquellas sustancias que lo hacen por difusión simple dicha relación es lineal, mientras que en las que lo hacen a través de un transportador la cinética sigue una función de saturación tipo Michaelis-Menten donde llega un punto que por más que aumente la concentración del contaminante, la velocidad de ingreso no

aumenta ($V_{\max}$) y en la cual puede calcularse la constante K_m que equivale a la concentración del contaminante que corresponde con $\frac{1}{2}$ de $V_{\max}$ (Figura 3.6.).

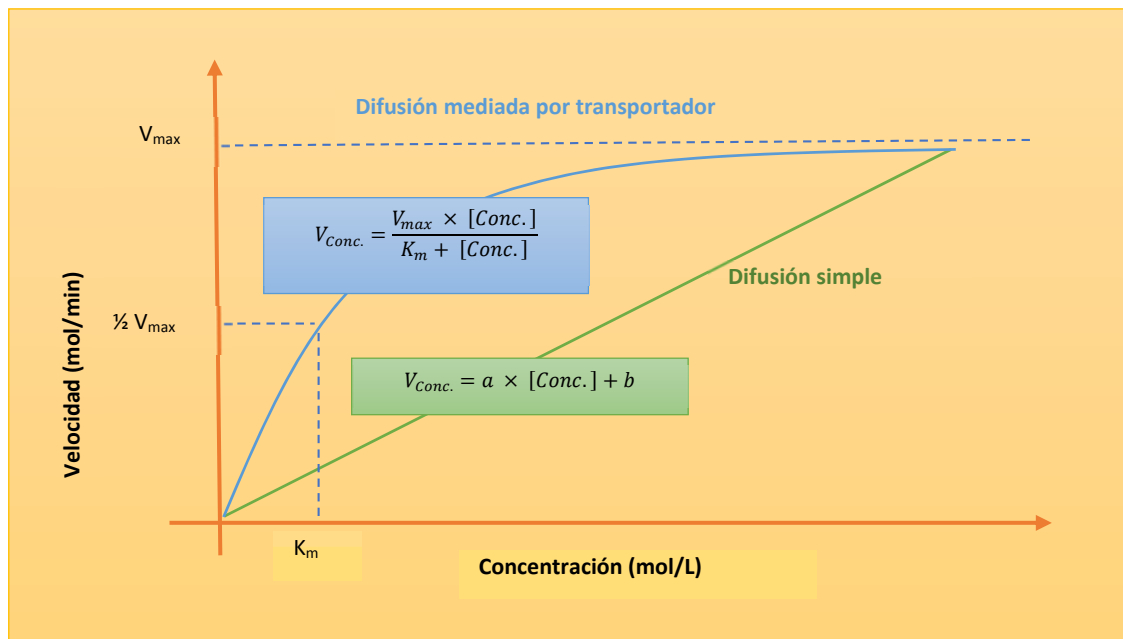


Figura 3.6. Diferencias en la cinética de acumulación entre un contaminante que atraviesa la membrana plasmática por difusión simple o por medio de un transportador.

La velocidad de difusión $\left(\frac{dx}{dt}\right)$ a través de las membranas puede ser estimada de acuerdo a la Ley de difusión de Fick:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{A \times D_m \times K_{mm} \times (C_o - C_i)}{d}$$

Donde, D_m es el coeficiente de difusión (cm^2/min), A el área de la membrana (cm^2), K_{mm} el coeficiente de partición membrana/medio (en general proporcional a K_{ow} y K_{oa}), C_o y C_i es la concentración (mol/L) externa (sobre la superficie de la membrana) e interna del contaminante (aproximadamente igual a la del plasma), respectivamente, y d es el grosor de la membrana (cm).

Sin embargo, la incorporación de un contaminante “in vivo” no sólo depende de la permeabilidad de la membrana, sino que puede estar limitada por la microcapa de medio estancada, por el flujo del medio externo o de la sangre, por lo que la expresión anterior puede generalizarse como:

$$\frac{dy}{dx} = P \times (C_m \times C_i)$$

Donde, P es el factor de control de difusión, C_m es la concentración en el medio y C_i la concentración interna. La expresión de P variará de acuerdo a cuál sea el factor limitante de difusión, la membrana, la microcapa de medio estancada o los flujos del medio o de la sangre de acuerdo a las siguientes expresiones:

$$P = \frac{D_m \times A \times K_{mm}}{d} \text{ (difusión limitada por la membrana)}$$

$$P = \frac{D_a \times A}{h} \text{ (difusión limitada por la microcapa)}$$

$$P = K_{bl} \times V_{bl} \text{ (difusión limitada por el flujo sanguíneo)}$$

$$P = V_m \text{ (difusión limitada por la ventilación)}$$

Donde, h es el grosor de la microcapa, K_{bl} es el coeficiente de partición sangre agua, V_{bl} el flujo sanguíneo (cm^3/min) y V_m el flujo de ventilación (cm^3/min).

La mayor parte de estos estudios han sido realizado con especies acuáticas, particularmente con peces observando que para contaminantes lipofílicos ($\log K_{ow} = 3-6$) la difusión se ve limitada por el flujo de ventilación, para contaminantes hidrofílicos ($\log K_{ow} < 1$) el factor limitante es el flujo sanguíneo y para aquellos de lipofiliidad moderada ($\log K_{ow} = 1-3$) la difusión es proporcional al K_{ow} , con una eficiencia de difusión similar a la del oxígeno (60%).

Distribución y almacenamiento

En organismos pluricelulares, un contaminante luego de ser incorporado a través de alguna de las vías de exposición mencionadas previamente puede pasar al sistema circulatorio y ser redistribuido (traslocado) a diferentes partes del cuerpo. En los vegetales los contaminantes luego de ser absorbidos por las raíces o las hojas, pueden ser traslocados a otras partes de la planta a través del xilema (transporte de agua) o el floema (transporte de sabia). En los animales, la distribución se da a través de los fluidos circulatorios como la hemolinfa en moluscos y artrópodos, o el plasma sanguíneo en anélidos y diferentes grupos de cordados. La tasa de distribución a los órganos o tejidos es determinada inicialmente por el flujo del fluido circulatorio y la tasa de difusión fuera del sistema circulatorio y luego por la afinidad del contaminante con determinado tejido. Por ejemplo, los metales suelen tener mayor afinidad para unirse a las proteínas (Cu, Fe, Zn, Cd) o la matriz ósea (Pb, Sr), mientras que los compuestos orgánicos lipofílicos se acumularán en mayor grado en el tejido adiposo (Clordano, DDT, PCBs, PBDEs). Algunos tejidos como el hígado suelen expresar proteínas especiales que les brindan una mayor capacidad de acumular ciertos contaminantes como el caso de las metalotioneínas que posee una afinidad particular por los metales o la ligandina por los ácidos orgánicos. El plasma no sólo cumple un papel importante en la distribución de los contaminantes, sino que, además las proteínas que lo componen se unen a ellos actuando como un depósito de almacenamiento. En la [Figura 3.7](#), se muestra un proteinograma (electroforesis de suero) mostrando los principales grupos de proteínas séricas y los contaminantes que suelen transportarse unidas a cada una de dichas fracciones.

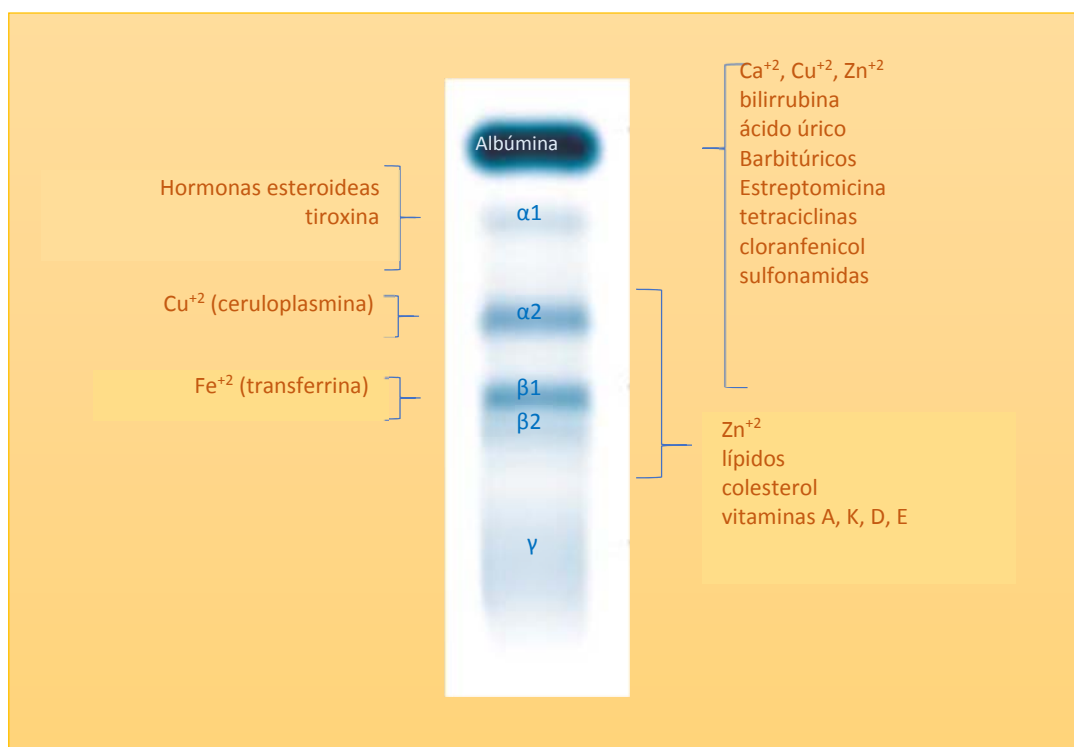


Figura 3.7: Proteinograma mostrando los principales grupos de proteínas séricas y los contaminantes a los cuales se unen, almacenan y distribuyen por el cuerpo de los vertebrados.

Un parámetro útil a tener en cuenta cuando se considera la distribución y almacenamiento de los contaminantes es el volumen de distribución (o volumen aparente de distribución, V_D) que se ha adoptado de la farmacología, donde es definido como el volumen teórico que contendría la masa de un contaminante equivalente a la concentración que se observa en el fluido circulante (ej. plasma). El V_D de un contaminante representa el grado en que éste se distribuye en el tejido corporal en lugar del plasma. Por tanto, el V_D no es un valor fisiológico, sino que es más bien un reflejo de cómo un medicamento se distribuirá por todo el cuerpo dependiendo de varias propiedades fisicoquímicas (Ej. solubilidad, carga, tamaño, etc.). Su expresión matemática es:

$$V_D = \frac{\text{cantidad total de contaminante en el cuerpo}}{\text{concentración del contaminante en el plasma sanguíneo}}$$

En ecotoxicología también suele utilizarse como el volumen de medio (agua, aire, suelo, alimento) que, según su concentración, se requeriría para contener una masa total del contaminante equivalente a la de la concentración en el plasma sanguíneo. En términos generales cuanto más lipofílico el contaminante mayor será su V_D . Numéricamente el V_D es igual al factor de bioconcentración.

Biotransformación

Una vez que un contaminante ingresa al organismo, este es susceptible de ser biotransformado, esto es, ser modificado por la acción biológica de determinadas enzimas. Tal biotransformación puede contribuir a la eliminación, detoxificación, secuestro, redistribución e incluso la activación del contaminante haciéndolo más tóxico.

En el caso de los metales y metaloides, los mismos pueden ser biotransformados, secuestrados (unidos a ligandos específicos) o biomineralizados. Ciertas bacterias poseen la capacidad de metilar o etilar el metal como es el caso de la transformación del mercurio iónico a metilmercurio. Algunas plantas son capaces de metilar el arsénico (ej. lactato de trimetilarsonio), unirlos a azúcares, betaína o fosfolípidos (ej. O-fosfatidil-lactato de trimetilarsonio). Las plantas también pueden ligar el selenio a aminoácidos modificados (ej. metil-seleno-cisteína) que pueden ser incorporados a proteínas. Además de las transformaciones antes mencionadas, los metales pueden ser secuestrados por proteínas específicas como las metalotioneínas y fitoquelatinas (plantas), proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteínas. Finalmente, los metales pueden ser eliminados mediante la biomineralización, siendo incorporados de esta forma en el exoesqueleto calcáreo de invertebrados o en la matriz calcárea de los huesos de vertebrados. También pueden ser biomineralizados en gránulos intra (Tipo A, pirofosfatos de calcio y magnesio en matriz de lipofuscina conteniendo metales clase A e intermedios como Mn y Zn; Tipo B, ricos en sulfuros conteniendo metales clase B como Cu, Cd, Ag, Hg, y Zn y Tipo C ricos en hierro producto de la ferritina) y extracelulares (Tipo D, de carbonato de calcio). En general los gránulos suelen estar asociados con el intestino medio, glándula digestiva hepatopáncreas, túbulos de Malpighi y riñón de invertebrados u otras células especializadas de invertebrados o tejido conectivo de vertebrados.

En el caso de los contaminantes orgánicos, el proceso de biotransformación generalmente consiste en modificar la molécula desde una forma más lipofílica en otra más hidrofílica (a excepción de la metilación y acetilación) con el objeto de facilitar la eliminación de la misma del cuerpo. Las reacciones que intervienen en dicho proceso se dividen en aquellas de Fase I y las de Fase II. Las de **Fase I** generan, mediante reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, un metabolito más hidrofílico y reactivo para subsecuentes transformaciones en la fase siguiente. En general ello conduce a metabolitos menos tóxicos y más fáciles de eliminar, pero en algunos casos puede generar la activación del contaminante generando un metabolito más tóxico que el compuesto parental. Ello ocurre con los pesticidas organofosforados generando un metabolito reactivo, el “oxon”, que inhibe a la enzima acetilcolinesterasa en las sinapsis colinérgicas. La oxidación del benzo(a)pireno, la aflatoxina y el cloruro de vinilo genera metabolitos reactivos que se unen al ADN. Además, la biotransformación de Fase I puede resultar en la producción de especies reactivas de oxígeno (ej. radical superóxido, O_2^-) causando estrés oxidativo en la célula y peroxidación lipídica. Los xenobióticos susceptibles de ser biotransformados por el sistema de detoxificación de Fase I suelen ser moléculas hidrofóbicas relativamente pequeñas, siendo una excepción los compuestos orgánicos fuertemente halogenados (Ej. dioxinas, PCBs) que suelen

ser refractarios a las reacciones de biotransformación de Fase I, presentando tiempos de residencia más prolongados ya que pueden ingresar a las células por difusión pasiva y ser almacenados, pero no eliminados efectivamente, siendo así, persistentes y bioacumulables.

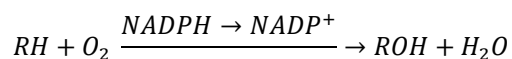
Las reacciones de **Fase II** generan, mediante reacciones de conjugación (unión covalente) con ácidos orgánicos (ej. glucurónico, sulfónico) o zwitteriones (glutación o aminoácidos como la glicina, taurina y glutamina), metabolitos más inactivos y fáciles de exportar por los sistemas de transporte activos mencionados previamente. La conjugación de metabolitos activados reduce o incluso elimina su efecto tóxico. Las reacciones de Fase II son de tipo sintética por lo que requieren de energía que es provista por la activación previa del conjugado endógeno o del propio xenobiótico. Algunos autores incluyen, además, una **Fase III** de detoxificación dada por la eliminación de los contaminantes a través de los sistemas de transportadores de membrana mencionados en la sección previa.

El sistema de biotransformación está conformado por un número limitado de enzimas con una amplia especificidad de sustrato por lo que suele presentar una gran superposición en los sustratos que metabolizan y muchas forman parte de vías normales de metabolitos endógenos, como es el caso de las enzimas del citocromo P450 en el metabolismo de los esteroides. Algunas de ellas son inducidas por la presencia de los propios xenobióticos, pero otras se expresan de forma constitutiva. Pese al amplio espectro de sustratos que son capaces de metabolizar, algunas de ellas poseen estereoselectividad, siendo capaces de diferenciar entre estereoisómeros de los contaminantes, metabolizando ciertos isómeros con mayor velocidad que otros. Además, presentan variaciones entre especies. Los peces, al poder excretar los tóxicos sin biotransformar vía branquial, poseen un sistema de biotransformación de Fase I menos eficiente que el de los organismos terrestres. Entre éstos, los insectos fitófagos lo poseen más desarrollado dado que las plantas de las que se alimentan poseen compuestos que actúan como xenobióticos. Incluso para una misma especie existen diferencias en la capacidad de detoxificación debido a polimorfismos genéticos de las enzimas del sistema de biotransformación. Se han observado, además, diferencias vinculadas con el sexo de los individuos. Los factores ambientales también pueden generar variaciones comparables a las genéticas y las interacciones entre contaminantes con acciones antagónicas o sinérgicas pueden tener un papel muy importante.

En cuanto a su localización celular, las enzimas que conforman el sistema de biotransformación pueden ser citosólicas, mitocondriales, microsomales, de membrana plasmática, hallarse en el plasma sanguíneo o incluso en la microflora bacteriana. Así mismo, estas enzimas pueden expresarse de forma diferente en los distintos tejidos de un organismo. En general, suelen hacerlo en mayor proporción en el intestino e hígado de vertebrados o el hepatopáncreas, cuerpos grasos o intestino de invertebrados. Si bien estos sistemas se hallan también en las plantas, su actividad es mucho menor que en los animales.

Existe un gran número de enzimas presentes en diferentes tejidos y compartimientos subcelulares que se hallan involucradas en los procesos de biotransformación de los xenobióticos ([Tabla 3.1.](#)). En relación a las reacciones de Fase I, uno de los principales sistemas de biotransformación es el de las enzimas **monooxigenasas del complejo citocromo P450** (posee un grupo

hemo con Fe^{+2}), a veces también referido como oxidasa de función mixta (MFO), que se encuentra localizado en la membrana del retículo endoplásmico liso. En vertebrados es más abundante en el hígado y en invertebrados en el hepatopáncreas y glándula digestiva, pero puede expresarse en casi todos los tejidos. En peces expuestos a xenobióticos puede ser inducido en la branquia y el intestino, que son importantes sitios de incorporación de los xenobióticos. El sistema, no sólo biotransforma a los xenobióticos, sino que además interviene en el metabolismo de hormonas esteroideas, prostaglandinas, sales biliares y ácidos grasos. Los componentes que conforman el sistema son: el citocromo P450, la NADPH-citocromo-P450 reductasa, el citocromo b_5 y la NADH-citocromo b_5 reductasa. La especificidad de sustrato está controlada por las diferentes isoformas de P450 y para su funcionamiento necesita NADPH, O_2 y fosfolípidos. El sistema cataliza reacciones de oxidación haciendo a los xenobióticos más hidrosolubles. La principal reacción que catalizan las monooxigenasas del P450 es la hidroxilación de los xenobióticos:



Sin embargo, también intervienen en reacciones de epoxidación, desalquilación, desaminación, sulfoxidación y desulfuración.

Otra familia de proteínas **monooxigenasas** son las que contienen **flavinas**, también se encuentran en el retículo endoplásmico liso y se especializan en la oxidación de xenobióticos conteniendo grupos nitro o sulfuro como aminas aromáticas y pesticidas organofosforados y carbamatos. También requieren de NADPH y O_2 para su funcionamiento y, a veces, suele ser difícil diferenciarlas de la actividad del P450. Se cree que son más importantes en moluscos donde la actividad del P450 es más baja.

En condiciones de bajos tenores de O_2 , se ha observado que tanto las monooxigenasas del P450 como las flavin-monooxigenasas pueden realizar reacciones de reducción, actuando por ende como **reductasas**. La reducción de compuestos halogenados conduce a deshalogenación (ej. conversión de p,p'-DDT a p,p'-DDD).

Otro grupo de enzimas de relevancia en la biotransformación de xenobióticos son las **epóxido-hidrolasas** que también es predominante en el retículo endoplásmico liso, aunque también hay variantes citosólicas y de membrana plasmática. La enzima cataliza la hidratación de una gran variedad de epóxidos aromáticos y alifáticos. Las epóxido-hidrolasas del retículo endoplásmico suelen biotransformar epóxidos generados por las monooxigenasas microsomales, sustancias que como se ha dicho son altamente electrofílicas y que en contacto con el DNA forman aductos con efectos carcinogénicos. Estas enzimas se han encontrado en todas las especies, siendo especialmente abundantes en el hígado de los vertebrados y el hepatopáncreas de los invertebrados.

Un grupo particularmente relevantes desde el punto de vista ambiental de enzimas de biotransformación de Fase I con las hidrolasas de la familia de las carboxilesterasas, colinesterasas y paraonoxonasas, aunque por cierto no son las únicas enzimas hidrolíticas involucradas en procesos de biotransformación. Las carboxilesterasas y colinesterasas corresponden al grupo de las serín esterases porque en su sitio catalítico poseen un residuo nucleofílico de serina. Este

sitio activo puede interactuar con el grupo fosfato de compuestos organofosforados (OP) y en base a ello Aldridge clasificó en 1953 a estas enzimas en esterasas de Tipo A, B y C, dependiendo si la enzima lo hidroliza, se ve inhibida o no interactúa de ninguna manera con el OP, respectivamente. Mientras que un grupo de Paraoxonasas pertenece al Tipo A, las carboxilesterasas y las colinesterasas pertenecen al Tipo B.

Tabla 3.1. Reacciones de biotransformación de los xenobióticos y localizaciones subcelulares

Reacción	Enzima/Reacción específica	Localización celular
Hidrólisis	Carboxilesterasa	Microsomas, citosol, lisosomas, sangre
	Butirilcolinesterasa	Plasma, mayoría de los tejidos
	Acetilcolinesterasa	Eritrocitos, mayoría de los tejidos
	Paraoxonasa	Plasma, microsomas, membrana mitocondrial interna
	Fosfatasa Alcalina	Membrana plasmática
	Peptidasa	Sangre, lisosomas
	β -glucuronidasa	Microsomas, lisosomas, microflora
	Epóxido hidrolasa	Microsomas, membrana plasmática, citosol
Reducción	Reducción azo y nitro	Microflora
	Reducción carbonilo (aldo/ceto)	Citosol, microsomas, sangre
	Reducción disulfuro	Citosol
	Reducción sulfóxidos	Citosol
	Reducción quinonas	Citosol, microsomas
	Dihidropirimidina deshidrogenasa	Citosol
	Deshalogenación reductiva	Microsomas
	Deshidroxilación	Mitocondria
	Deshidroxilación (aldehído oxidasa)	Citosol
Oxidación	Alcohol deshidrogenasa	Citosol
	Aldehído deshidrogenasa	Mitocondria, citosol
	Aldehído oxidasa	Citosol
	Xantina oxidorreductasa	Citosol
	Amino Oxidasas (Clase I)	Membrana mitocondrial externa, plaquetas
	MAO-A and B	Citosol, peroxisomas, plasma
	PAO	Citosol, núcleo
	SMOX	Citosólica, formas asociadas a membrana
	Amino Oxidasas (CuAOs) (Clase II)	Microsomas, matriz extracelular
	SSAOs (ej. AOC3)	Matriz extracelular
	DAOs	Microsomas, lisosomas, saliva
	LOs	Microsomas
	Peroxidasas	Microsomas, mitocondria
	Flavin-monooxigenasas	
	Citocromo P450	
Conjugación	UDP-glucuronosiltransferasa	Microsomas
	Acil-CoA sintetasa	Mitocondria
	Sulfotransferasa	Citosol
	Glutación transferasa	Citosol, microsomas, mitocondria
	Amino ácido transferasa	Mitocondria, microsomas
	N-acetiltransferasa	Mitocondria, citosol
	Metiltransferasa	Citosol, microsomas, sangre

Las **carboxilesterasas** son predominantemente microsomales y se encuentran en una gran variedad de tejidos entre los que se halla el hígado, intestino y riñón. Las carboxilesterasas intervienen, por ejemplo, en la hidrólisis de los insecticidas piretroides (ej. trans-permetrina). La hidrólisis de los xenobióticos por carboxilesterasas no siempre conduce a la detoxificación, si no que puede convertir al compuesto en una sustancia carcinogénica. Entre las **colinesterasas** se pueden distinguir dos tipos, la acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa o pseudocolinesterasa (BCHE). Ambas pueden ser encontradas en diversos tejidos y BCHE suele ser más abundante que AChE (ej. en plasma), salvo en cerebro y músculo donde AChE interviene en la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina. BCHE es menos específica en cuanto los sustratos y por ende posee un papel más importante que AChE en la biotransformación de xenobióticos. La BCHE plasmática es de relevancia en limitar la cantidad de neurotoxinas colinérgicas, como los insecticidas OP (ej. clorpirifós) que han sido transformados a oxon por el citocromo P450, los insecticidas carbamatos o incluso toxinas naturales como la anatoxina producida por las cianobacterias, que puedan alcanzar la AChE en el cerebro. Por último, las **paraoxonasas**, esterases del tipo Tipo A dependientes de Ca^{+2} , catalizan la hidrólisis de un gran número de organofosforados, ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos, carbonatos cíclicos, lactonas y fosfolípidos oxidados. Poseen un grupo sulfhidrilo que puede ser inhibido por Cu^{+2} y compuestos mercurícos. Puede hallarse en los microsomas hepáticos o en el plasma y una de sus variantes posee una importante actividad arilesterasa que le permite hidrolizar eficientemente el metabolito oxón de los insecticidas OP (Ej. paratión, diazinón, clorpirifós). Existe una gran diferencia entre especies en los tipos de esterases que expresan en los diferentes tejidos. En particular los humanos no expresan carboxilesterasas en plasma, contrariamente las aves poseen poca o nula expresión de paraoxonasas en dicho biofluido y algunos insectos directamente no presentan niveles medibles de tales enzimas.

En cuanto a las reacciones de Fase II, las **UDP-glucuronosil-transferasas** microsomales cumplen una importante función en la conjugación del ácido glucurónico (grupo polar) a una molécula lipofílica (endógena o metabolito de un xenobiótico biotransformado por reacciones de Fase I) y que presenta un átomo de hidrógeno lábil (ej. oxidrilo). El ácido glucurónico es provisto por un cofactor nucleotídico, el difosfato de uridina que es sintetizado en el citosol. Los glucurónidos formados se encuentran mayormente en el citoplasma (pH 7,4) como aniones que pueden ser exportados a los canalículos biliares o a los vasos sanguíneos por los transportadores mencionados previamente (ej. MRD, MRP). Los glucurónidos eliminados por la bilis al intestino pueden ser allí desconjugados por enzimas glucuronidasas y, en cierto grado, pueden ser reabsorbidos.

Otro grupo importante de enzimas del sistema de biotransformación de Fase II son las sulfotransferasas. Estas enzimas citosólicas catalizan la transferencia de un grupo sulfo desde una molécula donadora, en general la fosfoadenosina-fosfosulfato (PAPS) a un grupo alcohol o amina del xenobiótico formando un sulfato o una sulfoamina, respectivamente.

Tanto el cofactor PAPS como el metabolito sulfatado se encuentran en citoplasma, éste último como anión soluble. De forma similar a los glucurónidos, los conjugados sulfatados pueden ser hidrolizados por sulfatasas.

Quizá una de las más versátiles enzimas del sistema de Fase II es la **glutación-s-transferasa (GST)**. Esta enzima, es mayormente citosólicas, pero también pueden encontrarse en retículo o mitocondria. Si bien se encuentra distribuida en casi todos los tejidos, como en los casos anteriores, suele ser más abundante en el hígado de vertebrados y el hepatopáncreas de los invertebrados. Esta enzima cataliza la conjugación del glutatión reducido con una gran variedad de metabolitos electrofílicos, como los epóxidos formados por el P450, sin la necesidad de contar con un grupo hidroxilo. El glutatión es un tripéptido formado por los aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina. Las reacciones catalizadas por la GST no sólo incluyen las de epóxido-transferasas si no también arilo y alquilo transferasas. Las conjugaciones con glutatión suelen sufrir metabolizaciones subsiguientes previo a la eliminación, por ejemplo, siendo el en el riñón de vertebrados transformado a ácido mercaptúrico previo a la excreción en la orina. Por otra parte, la GST, no sólo cataliza la conjugación del glutatión, sino que también interviene en el transporte de metabolitos lipofílicos (endógenos o exógenos) a través del citoplasma hacia el sitio de acción de las enzimas de Fase I o en la formación de uniones covalentes con los epóxidos formados por el metabolismo de Fase I, previniendo así su interacción con el ADN u otras macromoléculas.

Eliminación

Una vez que los contaminantes ingresan al organismo, se distribuyen por el cuerpo, se acumulan en diferentes órganos y eventualmente se biotransforman, una parte de ellos será finalmente eliminada por diferentes vías y mecanismos dependiendo del contaminante y del tipo de organismo. En organismos unicelulares los contaminantes dependiendo de su peso molecular, lipofilicidad, estado de ionización y vía de biotransformación, serán eliminados por difusión pasiva o mediado a través de transportadores específicos ya sea de forma activa o pasiva. En las plantas la eliminación de los contaminantes podrá darse también por difusión a través de las raíces o las hojas, incluso aquellos con alta presión de vapor podrán difundir en forma gaseosa por los estomas. Sin embargo, por lo general los sistemas de eliminación de las plantas suelen estar limitados por la pared celular y muchos contaminantes son acumulados en las vacuolas y luego eliminados al perderse las hojas o incluso por acción de la herbivoría.

En los organismos acuáticos las branquias y el tegumento pueden tener un papel importante en la excreción. En los peces la eliminación de contaminantes de baja lipofilicidad ($\log K_{ow}$ 1-3) por la branquia suele ser rápida mientras que, más lentamente, también resulta una vía de excreción importante para compuestos más lipofílicos que no son fácilmente biotransformados tales como DDT, di-etil-ftalatos, fenol y pentaclorofenol. En artrópodos ciertos metales pueden ser excretados a través de la muda y en moluscos a través de los gránulos que

forman los caparazones. En los anfibios los contaminantes pueden difundir a través de la piel. En los animales terrestres el intercambio a través de la piel es más difícil ya que suelen estar recubiertos por elementos tegumentarios (escamas, plumas, pelos) que reducen el intercambio. Sin embargo, en las aves las plumas pueden ser una vía de eliminación de metales como el Pb y el Hg. En los mamíferos ciertos metaloides y metales como (ej. Hg) pueden ser eliminados en el pelo. En los animales terrestres los contaminantes volátiles pueden exhalados por las vías respiratorias durante el intercambio gaseoso. Las secreciones también pueden ser una vía de eliminación de contaminantes. En los mamíferos, los contaminantes lipofílicos (ej. DDT) o metales análogos del calcio (ej. Sr) pueden ser eliminados a través de la leche. Los desoves o partos pueden ser también vías de eliminación de contaminantes que se asocian al vitelo (ej. peces aves y anfibios) o que forman parte de las propias crías (mamíferos y otros organismos vivíparos) que pueden acumular contaminantes lipofílicos como los PCBs o el DDT.

Si bien no se trata estrictamente de un mecanismo de eliminación, un factor a tener en cuenta al evaluar la acumulación de un contaminante es la **dilución por crecimiento**. Este fenómeno es especialmente importante para aquellos organismos que crecen muy rápido y contaminantes que poseen altos pesos moleculares y K_{ow} muy elevados que suelen requerir de tiempo muy prolongados para alcanzar el equilibrio.

En los vertebrados, fundamentalmente en los terrestres, las principales vías de eliminación de los contaminantes suelen ser la urinaria y la biliar. Aquí el peso molecular del contaminante ha demostrado ser de relevancia ya que aquellas moléculas con pesos moleculares <300 Da suelen ser excretados por vía renal, mientras que las >600 Da lo hacen por vía biliar. El contaminante que ha ingresado al organismo por alguna de las vías descritas (epidérmica, respiratoria o digestiva), se ha distribuido a través del sistema circulatorio (sanguíneo, linfático), generalmente unido a proteínas de transporte, y se ha almacenado en diferentes tejidos donde puede ser biotransformado de forma tal de hacerlos más hidrosolubles y que puedan ser eliminados de las células mediante sistemas de transporte activo como las MRD (P-gp) o MRP nuevamente al sistema circulatorio (no unidos a proteínas) para finalmente ser excretados en órganos específicos, como el hígado y el riñón. En el **riñón**, el proceso de excreción involucra tres procesos, i) la filtración glomerular que se produce a través de los poros de los capilares sanguíneos (aproximadamente 70 nm) que dejan pasar moléculas hasta 60 kDa (más pequeña que la albúmina) y por tanto contaminantes unidos a proteínas plasmáticas no serán filtrados y sólo pasarán a través de los capilares aquellos solubilizados en el plasma o unidos a proteínas de menor tamaño; ii) el transporte pasivo que ocurre a través de los túbulos, un mecanismo menos relevante que la filtración del glomérulo, y iii) la secreción por transporte activo a través de los túbulos proximales a nivel de los transportadores mencionados previamente que se expresan selectivamente en las membranas basolaterales y apicales de las células epiteliales de los túbulos y regulan no sólo la excreción de xenobióticos desde la sangre (ej. OAT/OATP/OCT basolaterales y MRD/MRP/MATE apicales) si no también su reabsorción

desde la orina (ej. OAT/URAT/OCTN/PEPT apicales y MRP basolateral). La recaptación de Cd unido a metalotioneínas en los túbulos proximales ha sido asociado a la nefrotoxicidad de dicho metal. La otra vía importante de excreción es a través de la **bilis** que se produce en el hígado debido a que dicho órgano posee un papel importante en la detoxificación de contaminantes que ingresaron por la vía digestiva, dado que a través del sistema de circulación portal las sustancias absorbidas desde el intestino a la sangre pasan por el hígado siendo allí incorporadas por los hepatocitos, biotransformadas y excretadas a la bilis antes de que puedan distribuirse y alcanzar otros órganos blanco en lo que se denomina “efecto de primer-paso”. En los hepatocitos, la incorporación de aquellos contaminantes que no ingresan por difusión pasiva se da a través de transporte activo en el que intervienen diversos transportadores como OATP, OAT, OCT y NTCP mientras que en la excreción hacia la bilis intervienen transportadores como MRP en el transporte de aniones orgánicos (ej. conjugados con ácido glucurónico y glutatión), MRD para bases orgánicas, MATE especialmente para cationes orgánicos y BCRP para conjugados sulfatados.

Bioacumulación de los contaminantes.

Es importante comprender y poder predecir la acumulación de los contaminantes en la biota porque finalmente los efectos que estos causan son consecuencia de las concentraciones efectivas presentes en los órganos o tejidos blanco. Además, conocer como los diferentes contaminantes se acumulan en aquellos organismos de interés para el consumo permite prevenir potenciales riesgos para la salud humana.

Resulta importante distinguir entre los términos bioacumulación y bioconcentración. La **bioacumulación** refiere a la acumulación de un contaminante en un organismo desde cualquier fuente de exposición incluyendo aire, agua y alimento. El término **bioconcentración**, más restringido, proviene de la toxicología acuática y hace alusión a la acumulación sólo desde el medio (ej. agua).

La bioacumulación debe ser entendida como la consecuencia neta de los procesos de absorción, distribución, biotransformación y eliminación dentro de un individuo ([Figura 3.8.](#)).

Diferentes modelos pueden utilizarse para representar la acumulación de los contaminantes en la biota. Una de las aproximaciones más simples utilizadas para contaminantes orgánicos es un modelo que considera el reparto, en el equilibrio, del contaminante entre la biota y el medio dado por la siguiente expresión:

$$K_b = \frac{C_{org}}{C_w}$$

Donde, K_b es el factor de bioconcentración, C_{org} la concentración del contaminante en el organismo y C_w la concentración del contaminante en el agua (o el medio externo). Para contami-

nantes orgánicos se ha observado una relación directa entre K_b y K_{ow} (constante de reparto octanol/agua), siendo una de las regresiones lineales más utilizadas entre ambas variables la de Mackay (1982):

$$K_{org} = 0,048 \times K_{ow}$$

En dicho modelo el organismo se considera como un único compartimiento homogéneo englobado por una membrana lipídica y conteniendo una mezcla de agua lípidos con propiedades semejantes a las del octanol y asume que el tóxico es no reactivo ni metabolizable. Dicha regresión ha sido apropiada para describir la acumulación de contaminantes con un $\log K_{ow}$ entre 3 y 6, como se discutiera en una de las secciones precedentes, y para organismos como peces pequeños con un contenido de lípidos del 7,6%.

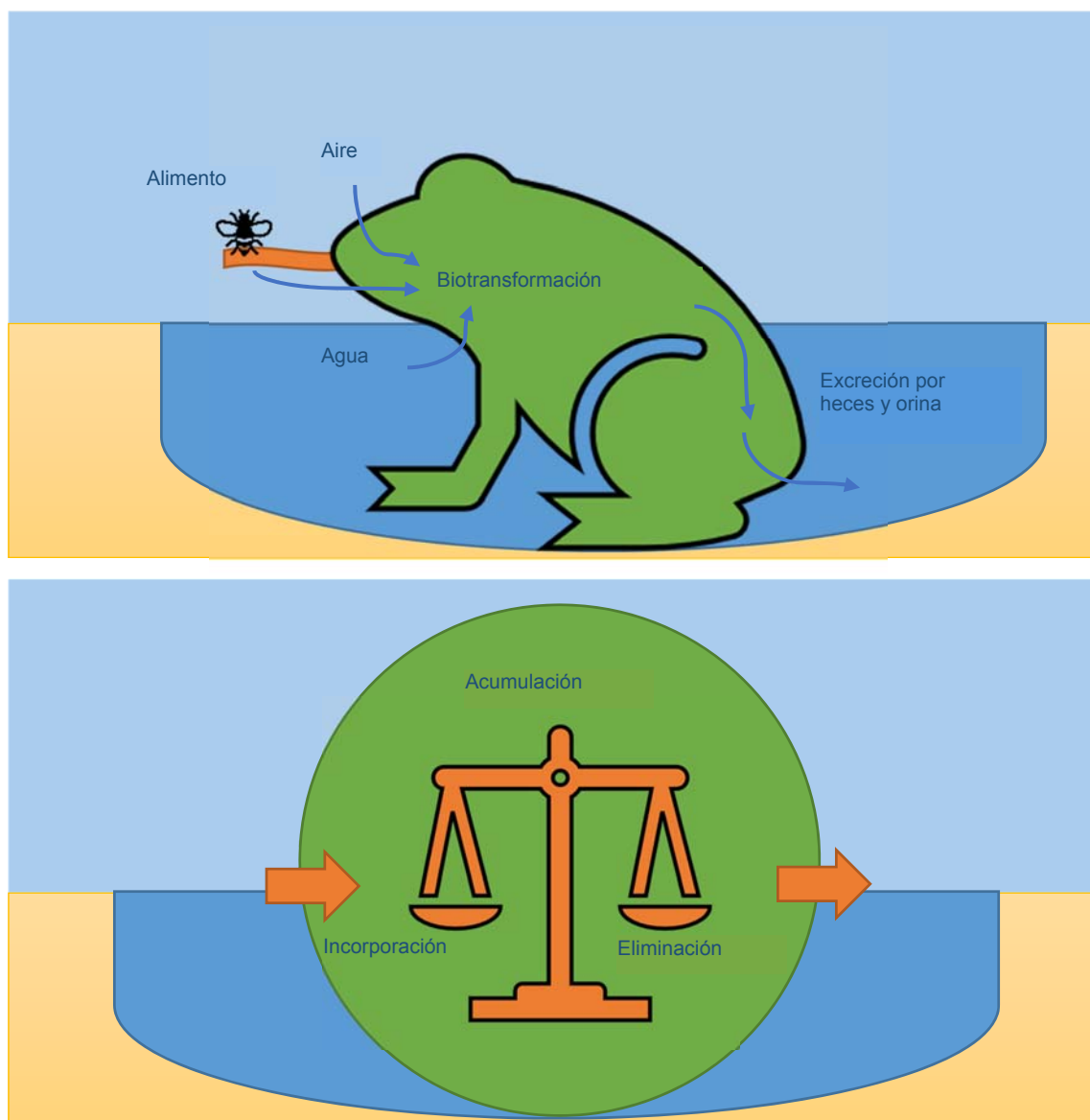


Figura 3.8. Esquema conceptual simplificado de los procesos que determinan la acumulación de los contaminantes en la biota

El factor de bioconcentración también puede expresarse en términos de la fugacidad (f), un concepto termodinámico que puede entenderse como la presión parcial o tendencia a escapar de una fase de una sustancia. La relación entre la concentración de una sustancia en una fase y la fugacidad viene dada por:

$$C = f \times Z$$

Donde, C es la concentración (mol/m^3), f la fugacidad (P_a) y Z la capacidad de fugacidad ($\text{mol}/\text{m}^3 \times P_a$). En el equilibrio, la fugacidad de una sustancia en dos fases diferentes es equivalente: $f_{org} = f_w$ y, por lo tanto:

$$\frac{C_{org}}{C_w} = \frac{Z_{org}}{Z_w}$$

Otra aproximación es a través de un modelo de cinética de transferencia de masas o toxicocinético. Desde la ecotoxicología, se puede definir a la **toxicocinética** como el análisis cuantitativo de la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los contaminantes mediante la medición y modelado de las concentraciones en el organismo (o sus tejidos) en función del tiempo. En los modelos toxicocinéticos, se considera que cuando la distribución del contaminante entre las dos fases no se encuentra en equilibrio termodinámico, existirá una transferencia de masas en favor del gradiente de concentración en favor de alcanzar el equilibrio. En el modelo más simple con las características previamente mencionadas, un único compartimiento mezcla de agua y lípido similar al octanol, la tasa de cambio en la concentración del contaminante en el organismo estará dada por la resultante entre la tasa de ingreso menos la tasa de eliminación según la expresión:

$$\frac{dC_{org}}{dt} = K_u \times C_w - K_e \times C_{org}$$

Donde, K_u es la constante de ingreso ($\text{Kg} \times \text{L}^{-1} \times \text{h}^{-1}$), C_w la concentración del contaminante en el agua (o el medio externo), K_e es la constante de eliminación (h^{-1}) y C_{org} la concentración del contaminante en el organismo. De aquí puede verse que la tasa de incorporación del contaminante depende de la concentración del contaminante en el agua:

$$\frac{dC_{org}}{dt} = K_u \times C_w$$

mientras que la tasa de eliminación depende de la concentración en el tejido:

$$\frac{dC_{org}}{dt} = -K_e \times C_{org}$$

Según esta ecuación, la velocidad de eliminación se estima de un modo análogo a la velocidad de salida del agua por un orificio inferior de un tanque de almacenamiento, la cual depende del volumen de agua dentro del tanque. La concentración del contaminante en un momento dado estará dada la integral de dicha función, que es una exponencial negativa:

$$C_{org} = C_{org(t_0)} \times e^{-K_e \times t} \therefore \ln C_{org} = \ln C_{org(t_0)} - K_e \times t$$

El tiempo para que la concentración en el tejido alcance la mitad será $t_{\frac{1}{2}} = \ln \frac{2}{K_2} = 0.693 \times K_e$. Si se consideran simultáneamente ambas fases, la de incorporación y eliminación la concentración del contaminante en el organismo en un momento dado puede estimarse como:

$$C_{org} = \frac{K_u}{K_e} \times C_w \times (1 - e^{-K_e \times t})$$

Una representación de como varía la concentración en el organismo en las fases de acumulación y eliminación en función del tiempo de exposición pueden apreciarse en la [Figura 3.9](#). Según el modelo la velocidad de ingreso y egreso del contaminante se equiparán a tiempo infinito (C_{max} en el equilibrio) y donde $e^{-K_e t} = 0$ y por tanto de la relación entre K_u y K_w se obtiene el factor de bioconcentración:

$$\frac{C_{org}}{C_w} = \frac{K_u}{K_e} = K_b$$

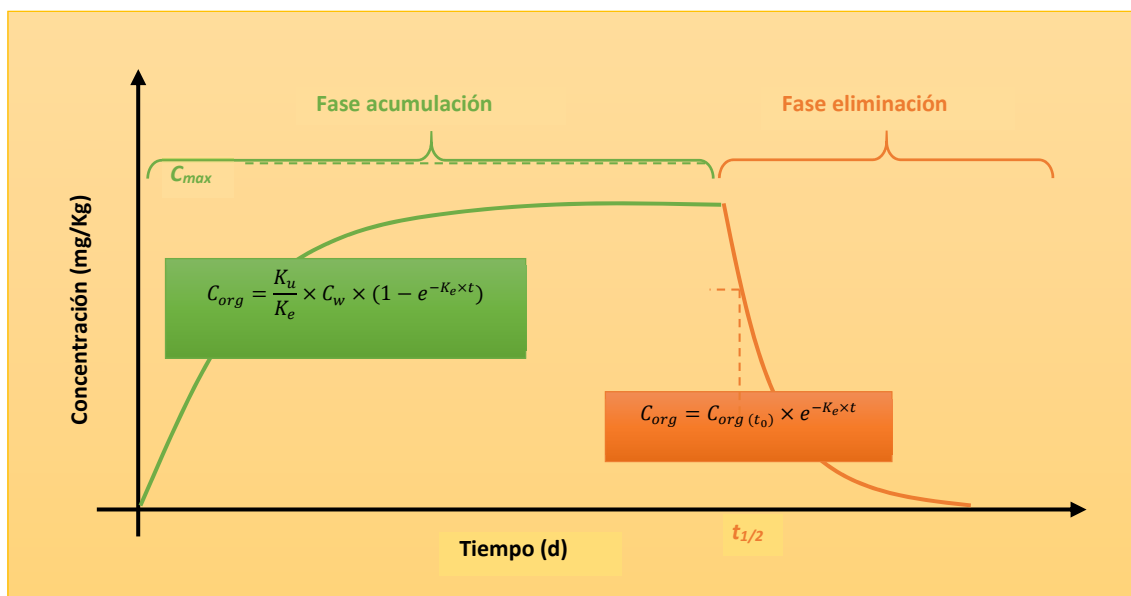


Figura 3.9: Modelo toxicocinético de acumulación de los contaminantes en la biota

Al modelo pueden incorporársele más de una fuente de exposición y más de un compartimiento de eliminación como sigue:

$$C_{org} = \frac{K_u \times C_w + \alpha R \times C_f}{K_{e1} + K_{e2}} \times (1 - e^{-(K_{e1} + K_{e2}) \times t})$$

Donde α =porcentaje de asimilación, R cantidad de alimento ingerido, C_f concentración en el alimento, K_{e1} y K_{e2} las constantes de eliminación de cada compartimiento. La ecuación generalizada estaría dada por:

$$C_{org} = \frac{\sum_{j=1}^m C_j \times K_{uj}}{\sum_{i=1}^n K_{ei}} \times (1 - e^{-\sum_{i=1}^n K_{ei} \times t}) + C_{org(t_0)} \times e^{-\sum_{i=1}^n K_{ei} \times t}$$

Donde además se agrega una $C_{org(t_0)}$ como una concentración inicial del contaminante diferente de 0. A medida que los modelos se complejizan se requiere mayor información para satisfacer sus parámetros y por tanto la utilidad de estos modelos será un compromiso entre su capacidad de predicción y su simpleza.

Desde un punto de vista regulatorio, existen diferentes criterios para establecer si una sustancia es bioacumulable o no. En el marco del control de sustancias peligrosas, para establecer el perfil PBT (Persistencia-Bioacumulación-Toxicidad) de una sustancia en relación con la Ley de Control de Sustancias Tóxicas (Toxic Substances Control Act) de Estados Unidos, la USEPA (United States Environmental Protection Agency) establece como criterios que una sustancia no es bioacumulable si su valor de K_b es <1000 , es bioacumulable si el valor de K_b se encuentra entre 1000 y 5000 y es muy bioacumulable si el valor de K_b es >5000 . En el marco del Reglamento para el Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas (REACH), la Agencia Europea de Sustancias Químicas (ECHA) establece que una sustancia es bioacumulable si K_b es >2000 (criterio B) y muy bioacumulable cuando K_b es >5000 (criterio vB).

Relación entre acumulación y toxicidad

La relación entre la concentración de un contaminante en su sitio blanco suele ser difícil de obtener y por tanto la concentración total de la sustancia en el organismo suele ser utilizada como una estimación substituta. El **residuo corporal crítico** (CRB) o **concentración efectiva interna** (IEC) ha sido definido por McCarthy como la concentración molar por peso corporal del organismo que provoca un punto final tóxico definido. Si ese punto final es la letalidad se lo conoce como **residuo corporal letal** (LBR), **concentración letal interna** (ILC)

o **carga corporal letal** (LBB). Para compuestos orgánicos lipofílicos ($K_{ow} > 2$) la concentración interna asociada a una mortalidad del 50% se puede relacionar, en el equilibrio, con el factor de bioconcentración y la CL50 a través de la expresión:

$$ILC_{50} = FBC \times LC_{50}$$

En tanto que en el modelo cinético la relación quedaría establecida por:

$$C_{org} = ILC_{50} \times (1 - e^{-K_e t})$$

Biomagnificación de los contaminantes

En los ecosistemas, las diferentes especies de una comunidad biológica se relacionan unas con otras a través de las redes tróficas que establecen que especies se alimentan, o son alimento, de cuales otras. Sin embargo, desde el punto de vista de la acumulación de los contaminantes, no es tan relevante el concepto de red trófica (quien se come a quien) sino que resulta más importante conocer el nivel trófico en el que se encuentra un organismo determinado y como es la acumulación del contaminante en los organismos de un nivel trófico respecto a los de otro nivel trófico (Figura 3.10.). En cualquier ecosistema se reconocen los siguientes niveles tróficos: productores primarios, consumidores de primer orden, consumidores de segundo orden, consumidores de tercer orden, etc., y descomponedores. Los productores primarios (ej. plantas terrestre y acuática, algas, fitoplancton) son aquellos organismos fotoautótrofos, o sea que pueden captar la energía lumínica proveniente del sol para fijar CO_2 y sintetizar moléculas orgánicas como azúcares que posteriormente se utilizarán como fuente de energía y para generación de biomasa. Esos organismos autótrofos servirán de alimento a los consumidores de primer orden (herbívoros terrestres y acuáticos, zooplancton), estos utilizarán las moléculas orgánicas sintetizadas por los productores primarios como fuente de energía y materia para su propio crecimiento y desarrollo. Los consumidores de segundo orden se alimentarán de los de primer orden y los de tercer orden de los de segundo orden y así hasta llegar a los predadores tope, consumidores que se encuentran en la cima de la pirámide alimentaria y que no poseen otros organismos que preden sobre ellos, en estado adulto y de forma significativa.

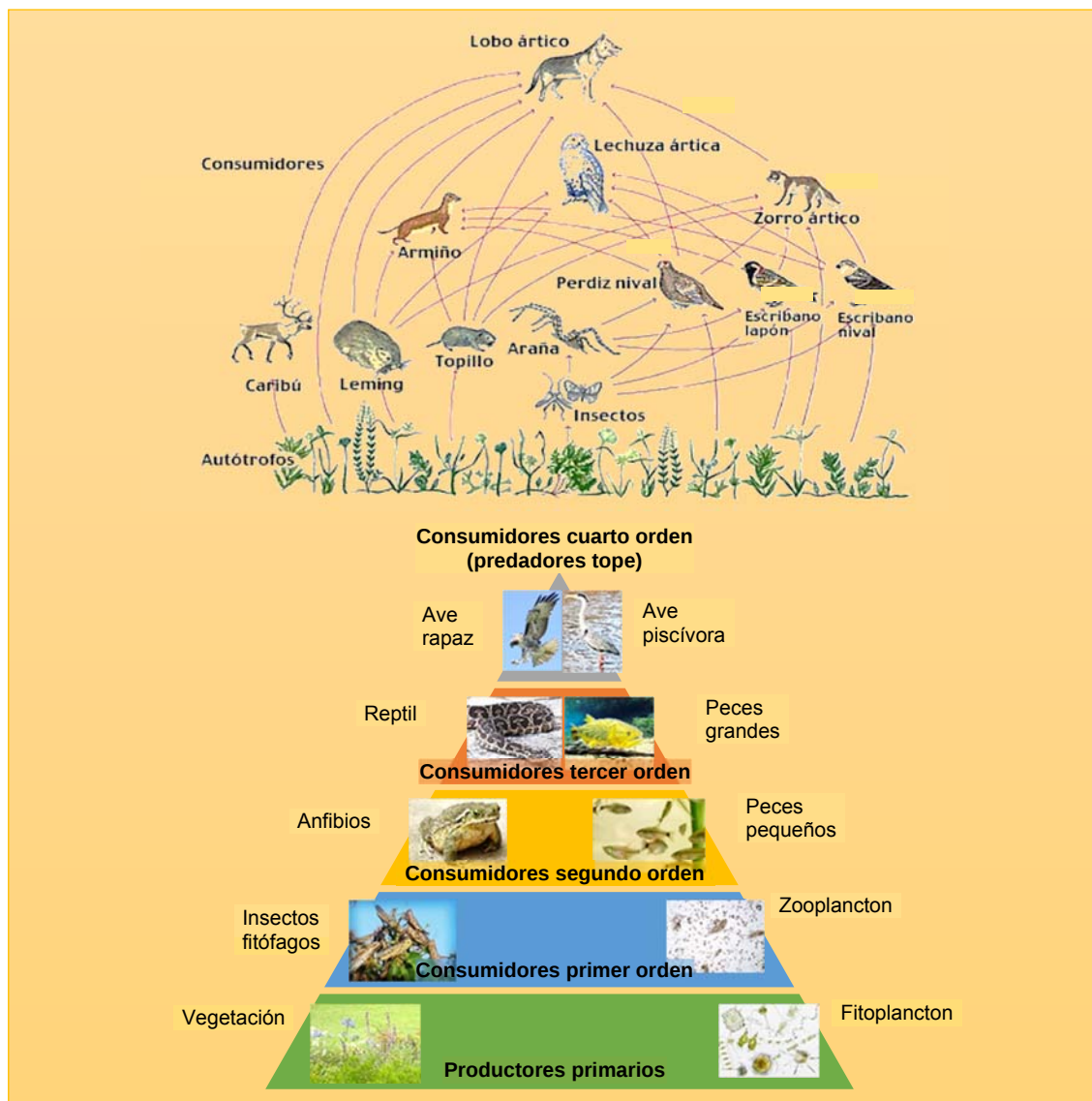


Figura 3.10: Diferencia entre red trófica (Panel superior) y niveles tróficos (Panel inferior) en los ecosistemas.

Dado que los organismos suelen alimentarse de más de una especie, que muchos son omnívoros (se alimentan tanto de plantas como de animales) y que existe cierta flexibilidad dependiendo de las características del ecosistema, no siempre resulta sencillo determinar el nivel trófico que ocupa una especie en particular y el mismo puede cambiar de un ecosistema a otro. Para posicionar a una especie en un nivel trófico, resulta de gran utilidad aprovechar la **discriminación isotópica** del C, N y S, fenómeno por el cual los isótopos pesados (^{13}C , ^{15}N , ^{34}S) se encuentran en las biomoléculas (ej. proteínas, ácidos nucleicos) se enriquecen respecto a los livianos (^{12}C , ^{14}N , ^{32}S) en cada transferencia trófica, debido a que éstos últimos son excretados del cuerpo más rápidamente. En particular la relación entre los isótopos del nitrógeno son los que mejor se adecúan como indicadores de nivel trófico empleando la variación en la concentración de ambos isótopos en un organismo respecto a dicha relación en el aire según la siguiente ecuación:

$$\delta^{15}N = 1000 \times \frac{\frac{^{15}N_{muestra}}{^{14}N_{muestra}}}{\frac{^{15}N_{aire}}{^{14}N_{aire}}} - 1$$

Las unidades de la variación en $\delta^{15}N$ se expresan en partes por mil. La diferencia de los valores de $\delta^{15}N$ entre niveles tróficos suelen ser muy variable, oscilando ente 1,3 ‰ y 5.3 ‰, pero en promedio se toma com o 3,4 ‰.

A partir de los valores de $\delta^{15}N$ se puede estimar el **nivel trófico** (TL) de un organismo en el ecosistema a través de la ecuación:

$$TL_{consumidor} = \frac{\delta^{15}N_{consumidor} - \delta^{15}N_{productor\ primario}}{^{15}N}$$

La diferencia de $\delta^{15}N$ entre consumidores y productores se utiliza para calcular el **factor de enriquecimiento**, que indica el incremento en de un nivel trófico a otro $\delta^{15}N$.

Los isótopos del C suelen ser un complemento útil a la hora de entender la fuente de carbono, sobre todo en ecosistemas acuáticos ya que la tasa fijación de ^{14}C y ^{13}C por las plantas C_3 y C_4 y en la disolución del CO_2 es diferente y por tanto con el $\delta^{13}N$ es posible saber si el origen de la materia orgánica es principalmente alóctono (aporte terrestre) o autóctono (fijación acuática).

La **biomagnificación** puede definirse como el incremento de la concentración de un contaminante de un nivel trófico a otro. Las razones que contribuyen a explicar porque hay contaminantes que se biomagnifican se vinculan a que los predadores suelen vivir más tiempo que las presas, que su tamaño es mayor, que poseen un mayor contenido lipídico y que su crecimiento es más lento y por tanto la dilución del contaminante por crecimiento menor.

Una forma relativamente simple de identificar rápidamente si un contaminante es capaz o no de biomagnificarse es comparar la concentración del contaminante en un organismo ubicado a un nivel trófico bajo contra la concentración en un predador tope, si las concentraciones son similares difícilmente el contaminante se esté biomagnificando, si por el contrario las concentración del contaminante son mucho mayores en el predador tope, muy probablemente estemos frente a un contaminante que tiene la capacidad de biomagnificarse. La forma de calcular de manera más precisa si un contaminante se biomagnifica o no es a través del **factor de biomagnificación** calculado del siguiente modo:

$$B = \frac{C_n}{C_{n-1}}$$

Donde, B es el fator de biomagnificación, C_n la concentración en los organismos de nivel trófico n y C_{n-1} en los organismos del nivel trófico inmediatamente anterior. El factor de biomagnificación también puede ser expresado en función de los parámetros del modelo de toxicocinética según:

$$B = \frac{\alpha R}{K_e}$$

Donde, α es la eficiencia de asimilación, R la tasa de alimento consumido (Kg/d) y K_e la constante de eliminación. Más comúnmente el factor de biomagnificación se obtiene a través de modelos de regresión lineal entre el logaritmo de la concentración del contaminante respecto a especies del ecosistema ubicadas en diferentes niveles tróficos por su $\delta^{15}\text{N}$, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\log C = \delta^{15}\text{N} \times b + a$$

Donde b , es la **pendiente de biomagnificación trófica (TMS)**.

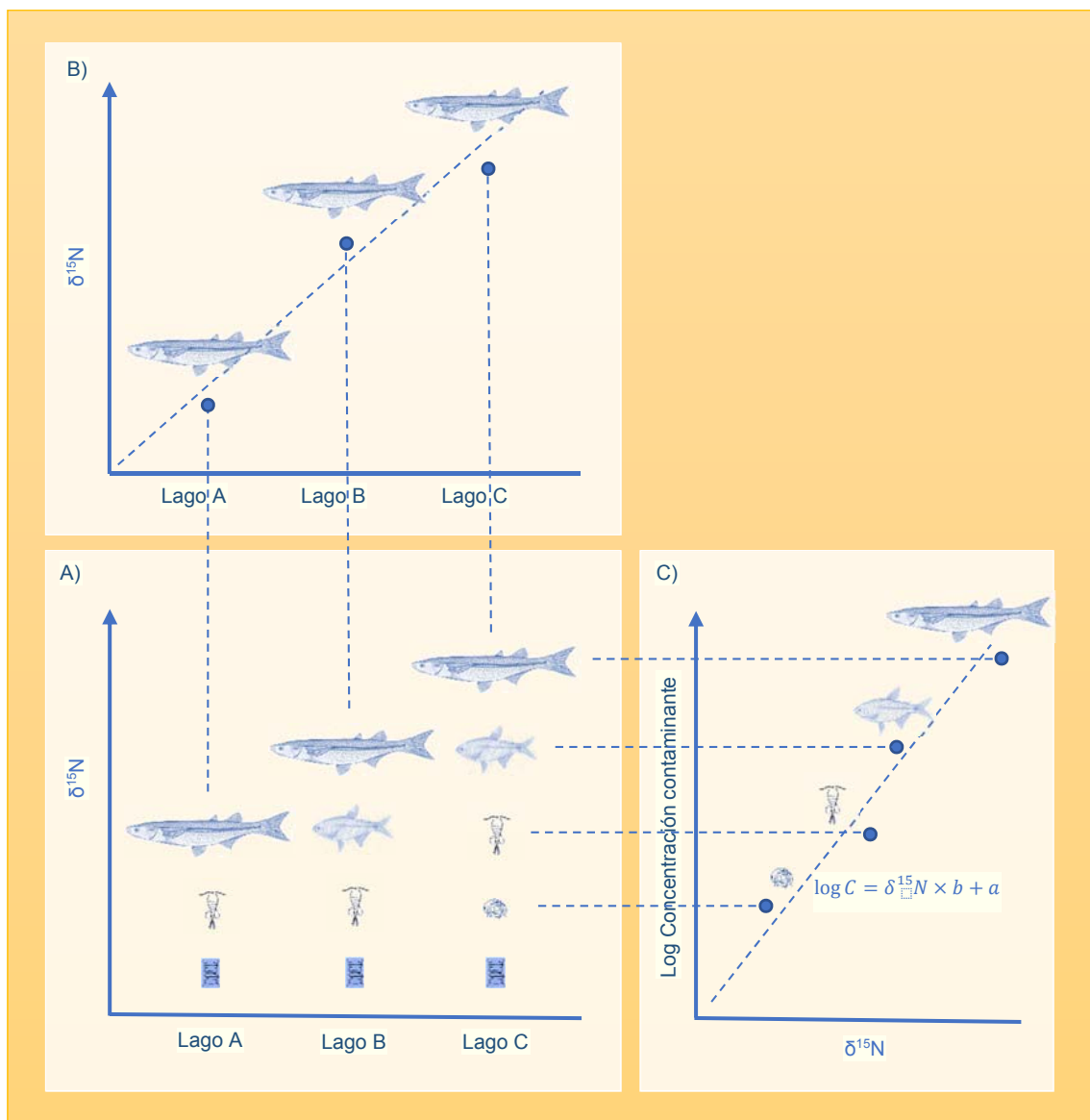


Figura 3.11: Relación entre los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en diferentes especies que ocupan distintos niveles tróficos en tres lagos hipotéticos de la región pampeana (Panel A). Valores de $\delta^{15}\text{N}$ para una misma especie de pez (ej. *Odontesthes bonariensis*) que ocupa diferentes niveles tróficos en los distintos lagos (Panel B). Relación entre el nivel trófico dado por el valor de $\delta^{15}\text{N}$ y la acumulación de un contaminante que se biomagnifica en diferentes especies de un mismo lago (Panel C).

Si en lugar de $\delta^{15}N$ se utiliza el nivel trófico (TL), la expresión queda como sigue:

$$\log C = TL \times b + a$$

Resulta importante reconocer que el nivel trófico de una especie puede variar de un ambiente a otro, por consiguiente, su identificación a partir de los niveles de $\delta^{15}N$ contribuyen a una estimación más precisa del factor de bioconcentración (Figura 3.11.).

Cuando existe biomagnificación el valor de la pendiente será $b > 0$. En contraposición, algunos contaminantes pueden presentar dilución trófica cuando en lugar de aumentar la concentración a través de los niveles tróficos, la concentración disminuye y entonces $b < 0$. Como referencia, los valores de b para el mercurio, elemento que se biomagnifica marcadamente, encontrada en un meta análisis realizado sobre datos de las redes tróficas de 69 ecosistemas acuáticos alrededor de todo el mundo (Lavoie et al., 2013), arrojó valores promedio para el mercurio total (THg) y el metilmercurio (MeHg) de $0,16 \pm 0,11$ y $0,24 \pm 0,08$, respectivamente, siendo la pendiente claramente mayor para la especie metilada.

Bibliografía

- Carriquiriborde, P., Díaz, J., Mugni, H., Bonetto, C., Ronco, A.E., 2007. Impact of cypermethrin on stream fish populations under field-use in biotech-soybean production. *Chemosphere* 68, 613-621.
- Carriquiriborde, P., Ronco, A.E., 2008. Distinctive accumulation patterns of Cd(II), Cu(II), and Cr(VI) in tissue of the South American teleost, pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Aquat. Toxicol.* 86, 313-322.
- Lavoie R.A., Jardine T.D., Chumchal M.M., Kidd K.A., Campbell L.M., 2013. Biomagnification of Mercury in Aquatic Food Webs: A Worldwide Meta-Analysis. *Environmental Science & Technology*; 47: 13385-13394.
- Newman, M.C., 2015. *Fundamentals of Ecotoxicology The Science of Pollution* (4th). CRC Press, Boca Raton, FL.
- Rand, G.M., 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment* Taylor and Francis, Washington, D.C.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., 2012. *Principles of Ecotoxicology* (4th). CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.

SEGUNDA PARTE

Efecto de los contaminantes sobre los organismos

CAPÍTULO 4

Bases sobre los efectos tóxicos inducidos por los contaminantes

Pedro Carriquiriborde

En los capítulos previos, se ha explicado como los contaminantes que ingresaron al ambiente y se distribuyeron en los diferentes compartimientos ambientales pueden estar más o menos biodisponibles para ingresar a los organismos, distribuirse por el/los sistema/s circulatorio/s, disponerse en los diferentes tejidos, biotransformarse, eliminarse y eventualmente acumularse respecto a las concentraciones externas. En el presente capítulo analizaremos como esos contaminantes almacenados en los tejidos pueden interactuar con las biomoléculas generando efectos tóxicos sobre los organismos que se manifiestan a diferentes niveles de organización y en función de la concentración y tiempo de exposición. En tal sentido, primero se describirán los mecanismos de acción de los contaminantes para luego abordar los efectos adversos que se pueden manifestar a nivel molecular, bioquímico, histológico, fisiológico y como ello puede afectar aspectos fundamentales para la viabilidad de las poblaciones como es la supervivencia. En capítulos subsiguientes se abordarán los efectos subletales que afectan el desempeño biológico de los organismos (desarrollo, crecimiento, comportamiento y reproducción).

Mecanismo y modos de acción de los contaminantes

Desde que un contaminante ingresa al organismo interactuará con las diferentes biomoléculas (lípidos, hidratos de carbono, proteínas o ácidos nucleicos) que constituyen las células y matriz extracelular de los tejidos. De acuerdo a su naturaleza, cada contaminante tendrá una afinidad diferencial por cada uno de estos componentes e interactuará con los mismos de una forma dada. Sin embargo, la acción tóxica del contaminante se desplegará sólo cuando alcance una concentración interna en el sitio blanco capaz de disrumpir la fisiología normal de las biomoléculas con las que interacciona. En tal sentido, importante diferenciar entre el concepto de mecanismo de acción y el de modo de acción. El **mecanismo de acción** de un contaminante está dado por proceso bioquímico de interacción xenobiótico-biomolécula, mientras que el **modo de acción** es la manifestación fisiológica y comportamental que caracteriza la respuesta adversa inducida específicamente por dicha interacción.

Las principales biomoléculas con las que interactúan los contaminantes son los lípidos de las membranas plasmáticas, las proteínas y el ADN, sin descartar las que puedan ocurrir con los hidratos de carbono y el ARN. Tres mecanismos de acción básicos (Figura 4.1.) pueden identificarse de acuerdo a las tres siguientes interacciones tóxico-biomolécula: i) las de **partición** del contaminante en las membranas biológicas son relativamente inespecíficas, reversibles y están estabilizadas principalmente por fuerzas de van der Waals; ii) las **estéricas** también estabilizadas por uniones débiles y reversibles entre aceptores y donadores de protones y/o fuerzas de van der Waals, pero donde resulta particularmente importante en el reconocimiento específico de receptores moleculares y la inhibición competitiva de los sitios activos de las enzimas y iii) la **reactiva** implica la formación de una unión fuerte no reversible, enlace covalente, entre un contaminante electrofílico (aldehído, epóxido, hidrocarburo alifático insaturado clorado) y un grupo nucleofílico de la biomolécula. Si bien los efectos adversos asociados a estas interacciones pueden ser revertidos por sistemas de defensa o desactivación metabólica, tales interacciones son el primer paso de la cascada de eventos que finalmente conduce a un efecto tóxico apreciable.

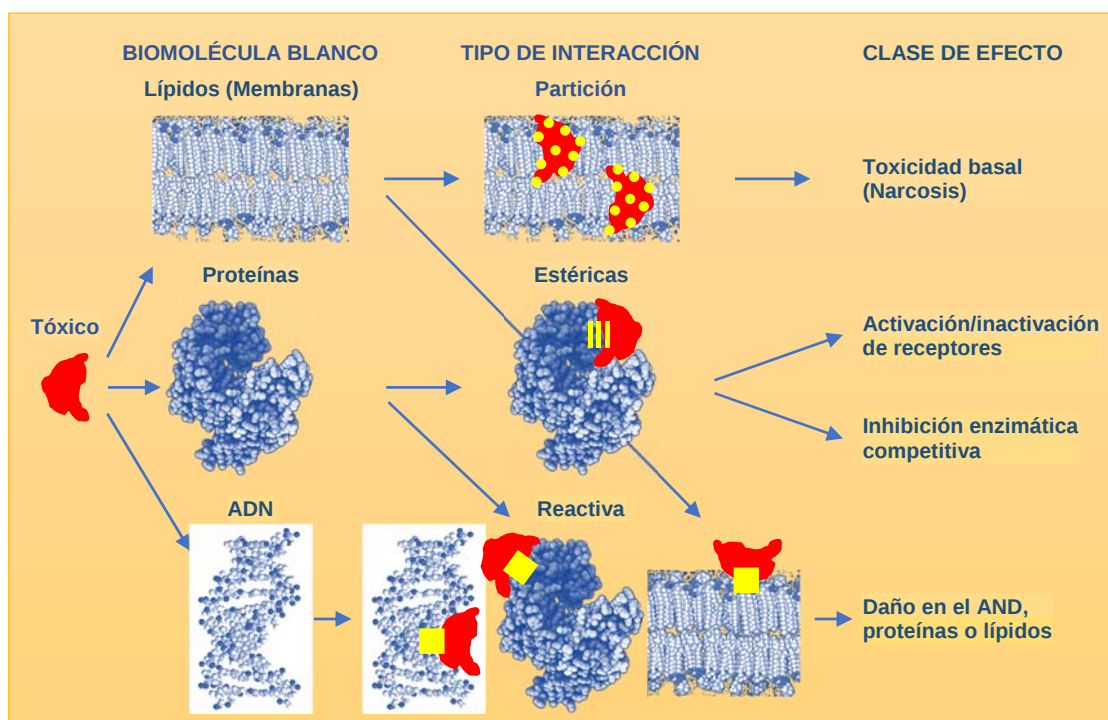


Figura 4.1: Mecanismo de acción de los contaminantes según el tipo de interacción con las biomoléculas blanco.

La vinculación de cada una de las tres interacciones con sitios blanco específicos (ej. membrana mitocondrial) ha permitido la clasificación de 10 grupos modos de acción diferentes (Tabla 4.1.). Uno de los modos de acción es la denominada **toxicidad basal o narcosis** que se refiere a la interacción inespecífica mediante fuerzas de van der Waals de sustancias lipofílicas con las membranas biológicas alterando su integridad y disrumpiendo así su fisiología normal. Esta interacción representa la toxicidad mínima de una sustancia determinada, es reversible y dada la inespecificidad las concentraciones efectivas de diferentes tóxicos es muy similar. Además, la exposición sucesiva a dosis subletales no modifica la sensibilidad del organismo.

Tabla 4.1: Relación entre sitio blanco, mecanismos y modos de acción de los contaminantes a nivel celular.

Biomolécula blanco	Subclase	Dominio	Interacción	Mecanismo molecular	Modo de acción	Test
Membrana biológica	General	M	NS	Disrupción no específica de la estructura y función	Toxicidad basal	Prueba de rojo neutro Kinspec
	General	M	S	Inducción de intermediarios reactivos (Ej. ROS) causando peroxidación lipídica y de proteínas.	Degradación de lípidos y proteínas	TBARs
	Trasducción de energía	M	N, NS	Mecanismo transportador de electrones	desacoplante	Consumo de O ₂ en mitocondria, Kinspec
		M	S	Bloqueo de quinonas y otros sitios de unión	Inhibición del transporte de electrones	
		M	S	Bloqueo de canales de protones	Inhibición de la ATP sintetasa	
Proteínas/péptidos	Fotosíntesis	M	S	Bloqueo del transporte de electrones	Inhibición de la fotosíntesis	
	General	M, C	NS, S	Reacciones electrofílicas y alquilación	Daño de proteínas y péptidos	Reducción de los niveles de GSH
	Receptores y enzimas	M, C	S	Unión no covalente a receptores y enzimas	Inhibición o competencia	Actividad enzimática Receptor de estrógenos Inducción de CYP1A1
	Receptores y enzimas	C	S	Unión no covalente a receptores y enzimas del metabolismo del ADN (replicación, reparación)	Mutagenicidad indirecta	Prueba SOS Prueba de Ames
ADN, ARN	General	C	NS, S	Ataque electrofílico y alquilación de bases nitrogenadas	Mutagenicidad directa	Aductos de ADN Inducción de mecanismo de reparación

M: membrana biológica, C: citoplasma, NS: inespecífico, S específico (adaptada de Escher et al., 2002)

Como se ha mencionado en el capítulo previo, para sustancias con un $\log K_{ow} > 2$, puede establecerse una relación, en el equilibrio, entre la concentración efectiva interna a nivel de la concentración en el cuerpo (ej. ILC_{50}) y la concentración en el medio (ej. LC_{50}) a través de la ecuación:

$$ILC_{50} = K_b \times LC_{50}$$

Los valores de ILC_{50} para toxicidad basal oscilan entre los 2 y los 8 mmol/Kg (peso del cuerpo) o entre 30 y 60 mmol/Kg de lípidos si se lo normaliza por el contenido lipídico. Estos valores disminuyen entre 0,6 y 2 mmol/Kg cuando se trata de sustancias más polares, efecto generalmente referido como narcosis polar. Sin embargo, esta diferencia no sería debida a diferencias en la concentración en la membrana sino por estimación del ILC por la concentración corporal que pondría de manifiesto la existencia de una distribución diferencial entre compartimientos blanco (membranas) y no blanco (ej. tejido adiposo) para sustancias apolares y polares. La IEC también ha sido útil para definir riesgo asociado a efectos subletales. En cuanto a la variabilidad en la sensibilidad entre especies frente a contaminantes con toxicidad basal se ha observado que, si bien pueden variar entre 5 órdenes de magnitud, suelen ser menores que las de contaminantes con mecanismos de acción específicos.

Los demás modos de acción están dados por interacción específicas estéricas y reactivas que generalmente suelen ser más tóxicas que la narcosis y su predicción a través de la concentración del residuo del contaminante en el organismo no es tan precisa dado que la misma no depende sólo de la concentración sino también de la actividad específica que posea el tóxico. Por tanto, los IEC no sólo son menores, sino que también varían más entre sustancia y sustancia según su modo de acción. Las diferencias en la potencia para este tipo de tóxicos, no sólo es mucho más variable entre compuestos por sus diferentes modos de acción, sino que también en cuanto a la sensibilidad entre especies para cada uno de ellos dado que, por ejemplo, un inhibidor de la fotosíntesis afectará más a los vegetales que a los animales. En cuanto a la relación entre el tiempo y la toxicidad, se observa que para aquellos tóxicos cuya interacción es irreversible se comportan siguiendo la ley de Harber (desarrollada originalmente para gases reactivos) que sostiene que el producto de la concentración y el tiempo de exposición es constante para una respuesta dada. Para este tipo de sustancias la toxicidad de las mezclas dependerá si el sitio blanco y el modo de acción es el mismo. Si es así, el modelo de adición es el que mejor se ajusta. De lo contrario, podrían actuar de forma sinérgica o antagónica en el caso que los componentes interactuaran unos con otros o actuaran sobre blancos que se encuentran relacionados como, por ejemplo, si uno inhibe la enzima de biotransformación del otro. Este es el caso típico del butóxido de piperonilo que es una sustancia que posee una toxicidad muy baja, pero que es un potente inhibidor del Citocromo P450, sistema que biotransforma a los insecticidas piretroides, y que por tanto en una mezcla potencia la acción de estos insecticidas.

Desde ya, existen tóxicos que pueden desencadenar diferentes modos de acción dependiendo de las características de su molécula y la concentración en diferentes sitios blanco. Por

ejemplo, los clorocatecoles pueden actuar como narcóticos a altas concentraciones durante exposiciones agudas, pero generar daños por estrés oxidativo a concentraciones más bajas y exposiciones crónicas, en presencia de Cu.

Manifestación de los efectos tóxicos de los contaminantes a nivel de los organismos

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, el objetivo de la ecotoxicología es comprender como los contaminantes afectan la estructura y función de los ecosistemas. Sin embargo, la acción directa de los contaminantes se ejerce sobre los organismos actuando a través de los mecanismos y modos de acción enumerados en la sección previa. Ello conducirá luego a efectos adversos que pueden impactar sobre variables fundamentales para el desempeño biológico de una especie y que aseguran el sostenimiento de la población y la interrelación con otras especies y con los factores abióticos del ecosistema. El mantenimiento de una población depende fundamentalmente de que los individuos puedan crecer, sobrevivir y reproducirse adecuadamente. Por lo tanto, cualquier efecto de un contaminante que afecte estas variables tendrá relevancia ecológica.

Las respuestas de los individuos a los contaminantes pueden manifestarse a diferentes niveles desde el nivel molecular, celular, histológico, fisiológico y ello finamente podrá traducirse como un efecto adverso sobre el crecimiento, la reproducción y la supervivencia. Los modos de acción a **nivel molecular**, ya enumerados, son el primer nivel de interacción directa del contaminante con el sistema biológico que, como ya se dijera, puede afectar la expresión de genes, la actividad enzimática o el funcionamiento de cualquier otro sistema subcelular (ej. membranas). Tales interacciones a nivel molecular tendrán como consecuencias respuestas a **nivel celular**, afectando la fisiología normal de las células (ej. alteración de la transmisión del impulso nervioso causada por varios insecticidas organoclorados y piretroides, alteración de la fotosíntesis por herbicidas como la atrazina), haciendo que se desregule el ciclo celular e induciendo la proliferación celular (ej. carcinógenos) o induciendo una muerte celular programada o no programada, entre muchas otras. Ello podrá generar cambios a **nivel histológico** que serán evidenciados como alteraciones histopatológicas tales como, por ejemplo, la aparición de adenomas o carcinomas en diferentes tejidos, la desmielinización del tejido nervioso, apoptosis y/o necrosis en el hígado (ej. cirrosis) u otros tejidos o afectando la proporción célula/matriz y/o de distintos tipos celulares (ej. aumento de células del cloro en las branquias, intersexos en las gónadas). En algunos casos, puede que los efectos no se manifiesten a nivel histológico, pero de alguna forma siempre se manifestará un efecto a **nivel fisiológico**, afectando el funcionamiento de los órganos y sistemas (ej. neurotoxicidad inducida por insecticidas, nefrotoxicidad causada por sustancias como el Cd o hepatotoxicidad o como el caso del alcohol, etc.)

Afortunadamente, frente a los insultos propinados por los contaminantes, los sistemas biológicos son capaces de contraponer, a diferentes niveles, mecanismos de reparación o compensación que les permite, dentro de cierto rango, contrarrestar el efecto tóxico del contaminante.

Por ejemplo, a nivel molecular, las células son capaces de activar sistemas de defensa tales como las enzimas del sistema antioxidante, de biotransformación o reparación del ADN. También respuestas a nivel fisiológico pueden reducir el efecto tóxico de los contaminantes como, por ejemplo, aumentando el ritmo cardíaco y la ventilación pulmonar para aumentar la eliminación de sustancias volátiles, aumentando la infiltración de células sanguíneas en los tejidos, o incrementando la secreción mucosa en la epidermis para evitar el contacto de sustancias agresivos para los epitelios.

En consecuencia, la manifestación o no de efectos adversos y el nivel de gravedad de los mismos dependerá en gran medida del balance entre la magnitud del daño infringido por el contaminante, que dependerá de la **intensidad de la exposición** (concentración y tiempo), y la capacidad de reparación/compensación que posea el sistema biológico (Figura 4.2). La forma que adopte tal relación dependerá tanto de las propiedades fisicoquímicas del contaminante como de las características biológicas del organismo. Por debajo de ciertas concentraciones, el contaminante puede que no genere ningún efecto adverso o inclusive induzca una respuesta beneficiosa (hormesis), siendo así el estado del organismo saludable. Al incrementarse la concentración puede que el contaminante cause un daño pero que el mismo pueda ser reparado o compensado y ello requiera de la activación de mecanismos que generan estrés en el individuo. Si la intensidad de la exposición es aún mayor, puede que esos mecanismos de reparación se vean sobrepasados y no puedan ser compensados, por lo tanto, el organismo comenzara a manifestar síntomas patológicos. Dependiendo del grado de daño, los efectos podrán ser curables, si el daño es reversible o incurables, si el daño ya es irreversible y si la exposición no cesa, el organismo finalmente morirá.

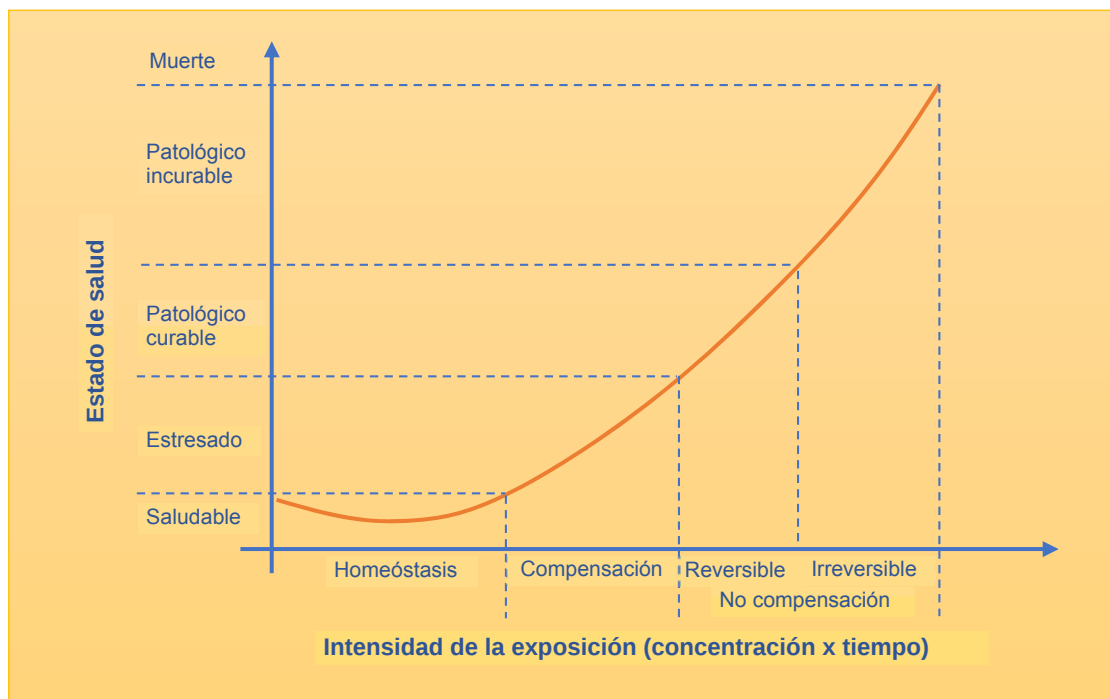


Figura 4.2: Relación entre la intensidad de exposición a un contaminante y el estado de salud de un organismo.

Es importante destacar que, además de los modos de acción específicos que se mencionaron anteriormente, los contaminantes pueden considerarse agentes que inducen estrés. En tal contexto, se define como **estrés** (o estrés Selyano) a un conjunto de respuestas inespecíficas (dado que responden de igual modo a diferentes agentes de estrés) pero bien definidas del cuerpo dirigidas a reestablecer o mantener la homeóstasis frente a la acción de un agente estresor que induce una demanda extraordinaria en el cuerpo. A dicho conjunto de respuestas se lo conoce como **Síndrome General de Adaptación** (GAS) y posee tres **fases**: i) la primera, es la de **alarma** y consiste en el aumento de la presión sanguínea, frecuencia respiratoria, el ritmo cardíaco y los niveles de cortisol, catecolaminas (epinefrina y norepinefrina), endorfinas y glucosa en sangre regulados tanto por el sistema nervioso simpático como por el eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal (HHA), ii) en la segunda fase, de **adaptación**, se observa una hipertrófica de dicho órgano y la hipotrofia de otros como el timo o el bazo, la aparición de úlceras, cansancio, falta de apetito y la pérdida de peso y iii) en la tercera fase, de **agotamiento**, el organismo falla en su capacidad adaptarse y si la exposición continúa terminará muriendo.

Entre las manifestaciones del efecto inducido por los contaminantes los más relevantes desde el punto de vista ecotoxicológico son aquellos que afecten de forma directa o indirecta la supervivencia y la reproducción de los organismos ya que son las dos variables más importantes desde el punto de vista del mantenimiento de la viabilidad de las poblaciones. El efecto sobre la **supervivencia** puede ser directo dado que el propio tóxico conduce a la muerte de los organismos por los mecanismos señalados en el párrafo anterior o indirecta si causan por ejemplo efectos sobre el desarrollo (ej. agentes teratogénicos como al Pb, benzo[a]pireno o los PCB's), el crecimiento (integra un conjunto de respuestas fisiológicas y bioquímicas que reflejan la aptitud individual), el comportamiento (incapacidad de alimentarse o mayor vulnerabilidad a la predación) o la susceptibilidad a contraer enfermedades endógenas o exógenas (causadas por agentes patógenos) que finalmente terminen por reducir la capacidad de supervivencia. Por otro lado, la **reproducción** también puede ser afectada de forma directa (ej. la alteración de las gónadas y la producción o liberación de game-tas) o de forma indirecta a través de alteraciones en el comportamiento reproductivo.

La relación dosis(concentración)-respuesta y tiempo-respuesta: indicador de la relación causa-efecto.

Si bien el término concentración posee mayor relevancia en la ecotoxicología, dado el uso difundido de la expresión curva dosis-respuesta (CDR) heredado de la toxicología, en este capítulo se utilizará el término dosis y concentración de forma indistinta de modo de simplificar la lectura. La existencia de una relación entre la dosis de una sustancia y su toxicidad es un concepto central de la toxicología. El padre de la toxicología moderna, Theophrastus Phi-

Ilippus Aureolus Bombastus von Hohenheim-Paraelsus (1493–1541), identificó tempranamente dicha relación indicando “*Sola dosis facit venenum*” (sólo la dosis hace al veneno) y estableció la dependencia dosis-respuesta como un baluarte de la toxicología. Cualquiera sea la respuesta seleccionada o medida, la relación entre el grado de respuesta del sistema biológico y la cantidad de tóxico administrado asume una dependencia tan consistente que se considera el concepto más fundamental y dominante en toxicología. Ello quiere decir que existe una relación entre el nivel de exposición, dada por la concentración o el tiempo, la cantidad de la sustancia que alcanza su el sitio blanco y el efecto biológico que desencadena. Al utilizar las curvas dosis respuesta se asumen tres principios básicos: 1) la respuesta observada en el organismo es debida a la sustancia a la que ha sido expuesto, 2) la magnitud de la respuesta está vinculada con la dosis y 3) existen tanto un método para cuantificar el tóxico y como una manera precisa de expresar la toxicidad.

El establecimiento de la función que describe dicha relación es fundamental para poder modelizarla y por tanto poder comprender y predecir el comportamiento de la respuesta incluso a concentraciones o tiempos que no se han ensayado experimentalmente. En toxicología suelen diferenciarse los términos de dosis efectiva, dosis tóxica y dosis letal, refiriéndose en el primer caso a la dosis de una sustancia que produce un efecto deseado, tóxico o letal, respectivamente. En ecotoxicología, el término **concentración efectiva** (EC_x) suele utilizarse de forma genérica, luego especificándose el tipo y magnitud del efecto. Por ejemplo, si se trata de la concentración que inhibe el 50% de la actividad de una enzima se denominará concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), si se trata de la concentración que produce una mortalidad de 50% se hablará de la **concentración letal 50** (LC_{50}) mientras que si se trata de la concentración que produce un 25% de mortalidad se referirá a la concentración letal 25 (LC_{25}). Gracias a la construcción de la CDR a través de un modelo matemático, es posible estimar la concentración efectiva para cualquier nivel de efecto.

De un modo diferente, la concentración más alta que no produce efecto (**NOEC**) o la más baja que produce efecto (**LOEC**) respecto al grupo control suelen estimarse a partir de concentraciones ensayadas, por lo cual, cuán lejos estén una de la otra dependen del diseño experimental y existirán en teoría infinitas concentraciones entre una y la otra. Los valores de NOEC y LOEC se estiman a partir de las diferencias obtenidas a partir de un test de hipótesis realizado mediante alguna prueba estadística paramétrica (ej. análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test a posteriori como el Dunnett) o no paramétrica (ej. Kruskal-Wallis). En algunos trabajos se han estimado el NOEC y el LOEC a partir de la EC_{10} y la EC_{25} , respectivamente. Dadas las limitaciones mencionadas para obtener el NOEC y el LOEC, estos valores están siendo substituidos con fines regulatorios dado que es más robusto trabajar con la función de toxicidad que con estos valores aislados.

De acuerdo al tipo de respuesta, pueden distinguirse dos tipos principales de relaciones dosis-respuesta. Por un lado, una de tipo **gradual**, en la cual la variable biológica que se analiza es continua en relación a la concentración de exposición. Ejemplo de ello sería la inhibición de la

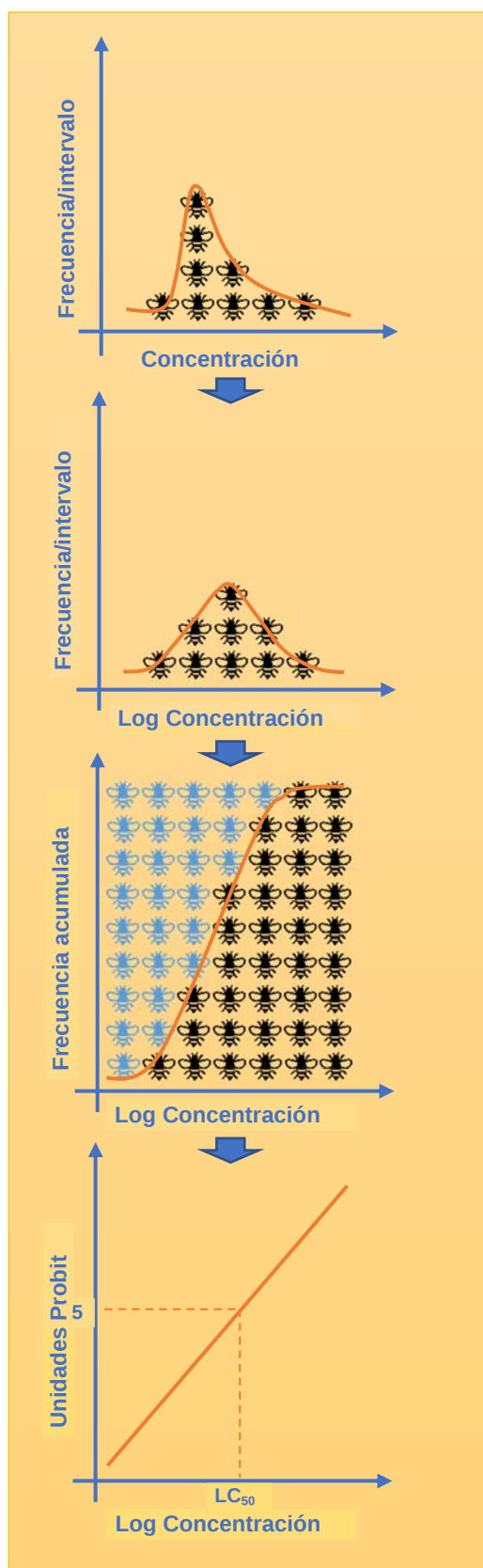


Figura 4.3: Curva dosis-respuesta de tipo cuantal para respuestas todo/nada como la mortalidad y su linealización a través de la transformación a unidades Probit

enzima AchE en el cerebro al aumentar la concentración de exposición a un pesticida organofosforado. Por otro lado, una de tipo **cuantal**, cuando la variable biológica es discreta, esto quiere decir que posee una respuesta de tipo todo o nada, para una concentración dada se observa o no el efecto en un individuo y, en la curva, la variable respuesta es la proporción de individuos que respondieron respecto al total de la población. El caso más característico es la mortalidad. En una población expuesta a una cantidad dada de un tóxico y tiempo determinados, un organismo estará vivo o muerto.

En el caso particular de la CDR cuantal, la misma se ha basado inicialmente en el concepto de **dosis efectiva individual (EID)** o **tolerancia individual**. Dicho concepto sostiene que para cada individuo de una población existe una dosis mínima capaz de causar su muerte y que es característica de cada individuo. Esto quiere decir que en una población dada existen individuos más sensibles y otros más tolerantes y que si se los expone en repetidas ocasiones al mismo tóxico, cada uno siempre responderá de la misma forma, siendo que los primeros responderán a concentraciones más bajas que los segundos. De acuerdo a este concepto, la frecuencia de la respuesta en la población se comporta siguiendo una distribución sesgada a la izquierda que se normaliza (adquiere la forma simétrica de la distribución normal) al expresarla en función del logaritmo de la concentración (tipo log normal), que a su vez puede expresarse como frecuencia acumulada y finalmente convertida a unidades Probit de forma tal de linealizar la función (Figura 4.3.). Las unidades Probit se obtienen de la transformación del porcentaje de respuesta a un metámero construido a partir de obtener el valor de z ingresando con el porcentaje de mortalidad acumulado en la tabla de distribución normal equivalente (NED), de valor promedio igual a 0 y el desvío

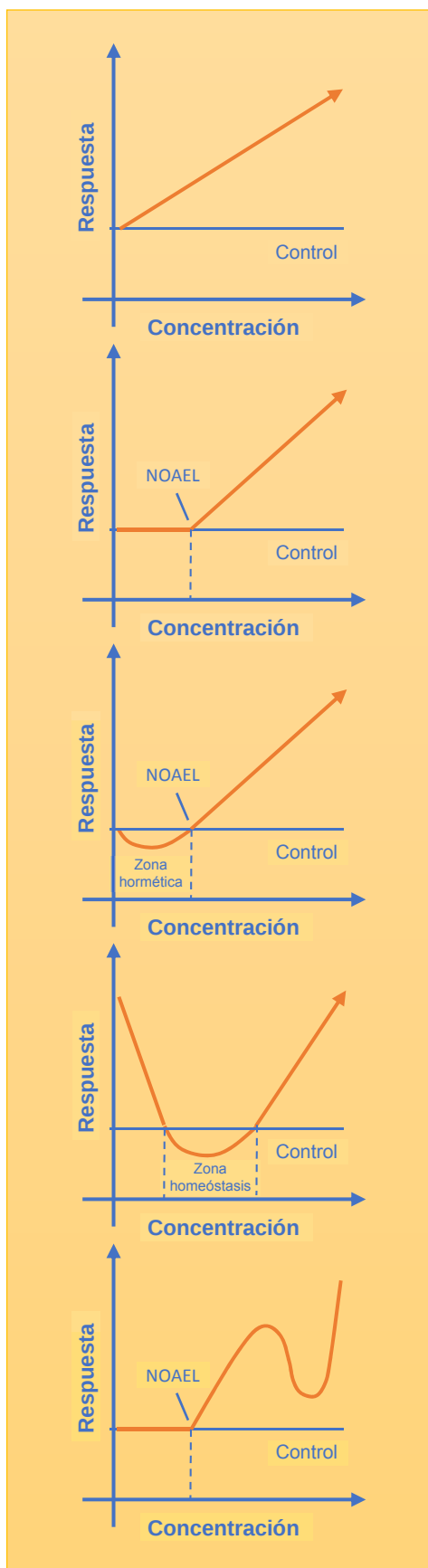


Figura 4.4: Modelos de curvas dosis-respuesta (CDRs)

estándar de 1, y sumándole 5, para evitar los valores negativos. Por consiguiente, una mortalidad del 50% coincidirá con un valor de z de 0 y por tanto equivaldrá a 5 unidades Probit, una mortalidad del 16% y 84% con un valor de -1 y 1 para z y de 4 y 6 unidades Probit. Otros métodos como el Spearman-Kärber, el de la media móvil o incluso el método semigráfico de Litchfield-Wilcoxon pueden ser utilizados para estimar la LC_{50} .

El concepto de tolerancia individual ha sido contrastado con la posibilidad que la respuesta de los organismos en una población expuestos a un tóxico sea estocástica, ello quiere decir que quienes responden a concentraciones más bajas o más altas es una cuestión de azar y que si se repitiera la exposición no siempre los más sensibles o más tolerantes serían los mismos individuos, sino que ello variará entre exposiciones de modo azaroso. Esto ha llevado utilización de diferentes modelos como el log-normal, el log logístico y el Weibull entre otros, para su descripción.

Dado que experimentalmente se han obtenido evidencias que apoyan tanto el modelo de tolerancia individual como el estocástico, más recientemente se ha propuesto el **Modelo de Supervivencia de Umbral Unificado** (GUTS). El mismo establece una relación matemática entre los dos modelos previamente mencionados, según el cual, la respuesta estocástica daría lugar a mecanismos de daño/repación sistemáticamente más rápidos que la tolerancia individual por lo cual el mecanismo de respuesta estaría inherentemente vinculado a la velocidad de recuperación del daño.

Si bien el tipo de relación entre la concentración y la respuesta, especialmente tratándose de efectos letales, más frecuentemente se visualiza como **curvas monotónicas** y generalmente de forma sigmoidea, las relaciones entre la concentración y la respuesta tóxica pueden ser interpretadas por diferentes funciones, en particular para efectos subletales, siendo tres los modelos más utilizados, el

lineal, el umbral y el hormético (Figura 4.4.). En el **lineal** se asume que no existe una concentración segura y es el modelo utilizado para describir la relación dosis-respuesta de sustancias carcinogénicas. El modelo **umbral**, se asume que existe una concentración límite por debajo de la cual no existen efectos adversos. A tal concentración se la denomina “nivel de no efecto observado” (**NOAEL**), que en otras palabras puede definirse como la mayor concentración de la sustancia que no produce un efecto adverso. También es importante considerar que algunas sustancias pueden presentar respuestas **no-monotónicas** como las representadas en el modelo **hormético**. Este modelo está vinculado al concepto de **hormesis**, el cual considera que por debajo del NOAEL la sustancia posee un efecto benéfico para la salud de los organismos. La zona hormética puede extenderse hasta 10 veces por debajo de la concentración del NOAEL y generar una respuesta de estimulación de hasta 160% respecto al control. Aquellas sustancias que son elementos esenciales (ej. Cu, Fe) pueden tener efectos adversos tanto a concentraciones mayores al NOAEL por efecto tóxico, como a concentraciones muy bajas por efecto de la deficiencia. En tal caso se dice que la **respuesta en forma de “U”**. Es importante resaltar que la respuesta monotónica puede ser directa o inversamente proporcional a la dosis, dependiendo como se exprese la respuesta biológica. Por ejemplo, la relación será directa si la expresamos en término de la mortalidad, pero indirecta si lo hacemos en términos de la supervivencia. Lo mismo ocurrirá con la actividad de una enzima que es inhibida por un contaminante, si se expresa en términos de la actividad absoluta, la relación será inversa, mientras que si se la expresa en términos del % de inhibición será directa. Otro tipo de respuestas no monotónicas son las comúnmente desencadenado por los disruptores endocrinos (ej. Bisfenol-A) que a concentraciones bajas pueden inducir la expresión de determinados receptores, pero inhibiéndolos a concentraciones altas.

Las CDR, además de describir la función de toxicidad de cada sustancia, permiten comparar la potencia y eficacia de diferentes sustancias (Figura 4.5.). La **potencia** puede ser definida como el intervalo de concentración de una sustancia que produce una respuesta creciente y que en la práctica puede obtenerse a partir de la dosis efectiva (concentración que produce un efecto dado). Por otra parte, la eficacia máxima, o simplemente **eficacia**, es el valor máximo de una respuesta dada que puede inducir una sustancia y está dada por el valor máximo de dicha respuesta. Otra información útil que puede obtenerse de las CDR para la comparación entre tóxicos es la **pendiente** de la curva, la misma informa sobre cuán abrupta es la respuesta en función del cambio de concentración. Los efectos tóxicos producidos por algunos contaminantes se van incrementando de manera paulatina a lo largo de un intervalo amplio de concentraciones y poseen una CDR más aplanada, mientras que para otros una pequeña diferencia en la concentración produce un cambio brusco en la respuesta, mostrando una CDR más empinada.

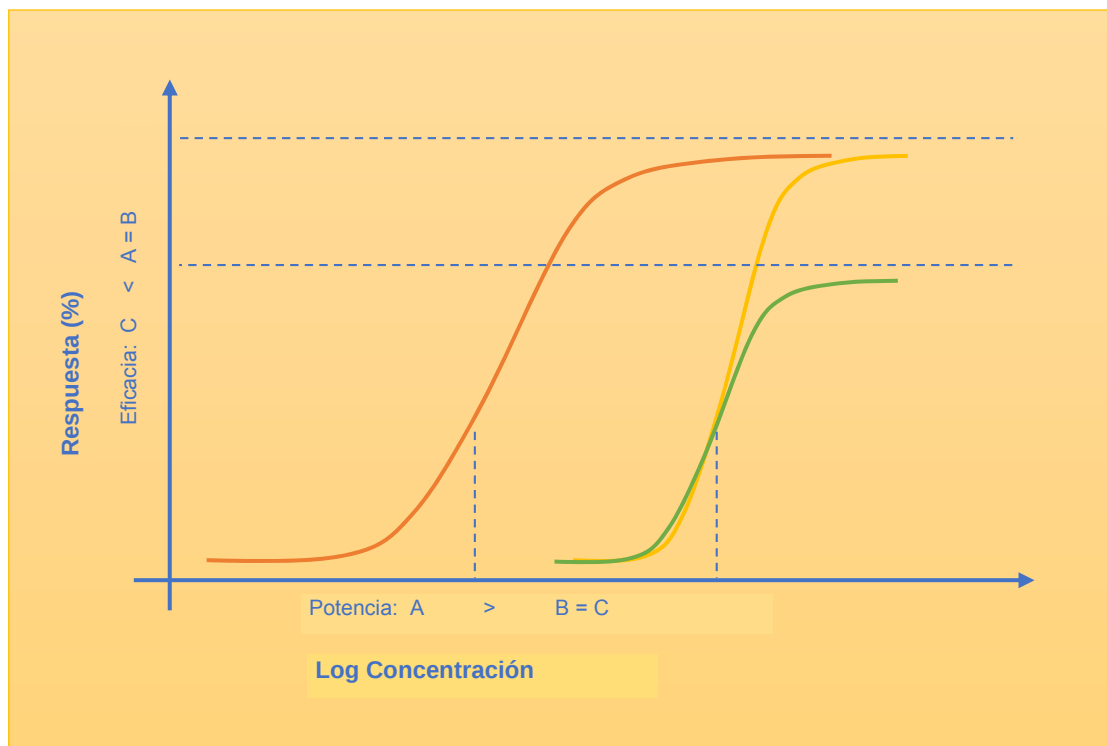


Figura 4.5: Relación entre potencia y eficacia de diferentes sustancias

Como se ha mencionado previamente en una población existen **diferencias entre individuos** en la respuesta a una sustancia debido, por ejemplo, a la existencia de pequeñas diferencias genéticas (polimorfismos) entre ellos. Así también existen **diferencias entre especies** que generalmente son más marcadas y pueden no ser sólo cuantitativas, sino también cualitativas. Tales diferencias deben ser consideradas si se extrapolan resultados obtenidos a partir de una especie a otra. El concepto de **toxicidad selectiva** se refiere justamente al efecto tóxico que puede tener una sustancia sobre una especie dada y no sobre otra y que pueden tanto radicar en procesos de absorción, biotransformación, excreción o la presencia o ausencia del sitio blanco en una de las especies, como podrían ser enzimas de una vía metabólica exclusiva de un grupo. Esta diversidad ha sido aprovechada para el desarrollo de agentes que son letales para una especie no deseada y no para otras. Por ejemplo, un herbicida afectará una vía metabólica exclusiva de los vegetales (ej. fotosíntesis) sin afectar a los animales.

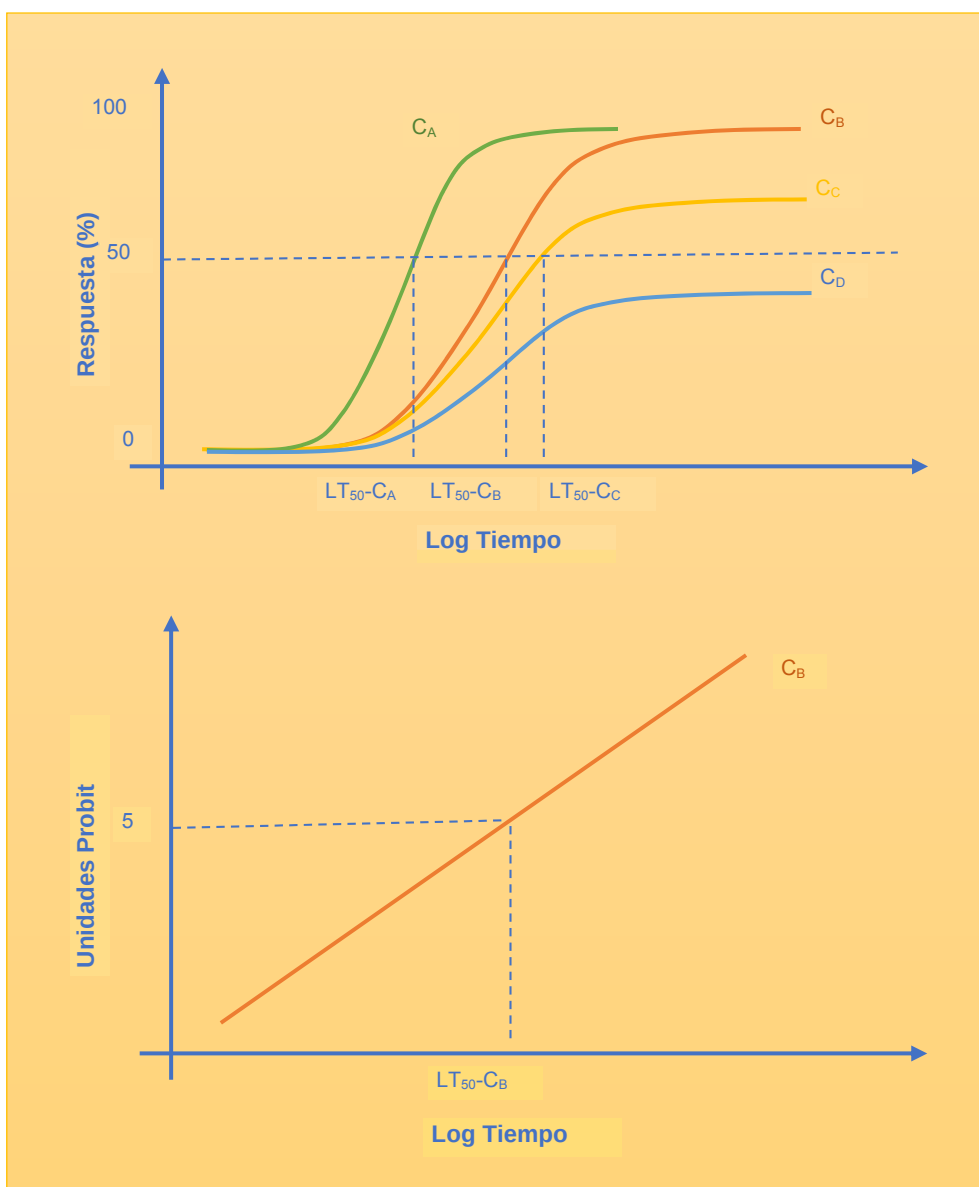


Figura 4.6: Curvas tiempo-respuesta (CTR)

El efecto tóxico de una sustancia, no sólo depende de la concentración sino también del tiempo de duración de la exposición. En tal sentido es importante conocer la **relación tiempo-respuesta**. Poder determinar del tiempo que demorará en manifestarse un determinado efecto bajo a un determinado nivel de exposición es extremadamente útil en ecotoxicología. Dicho tiempo dependerá de la toxicocinética de la sustancia que determinará la velocidad y el grado con que una sustancia se acumula en los tejidos blanco hasta alcanzar la EIC (concentración interna efectiva). Por consiguiente, del mismo modo que es posible elaborar las CDR es posible construir curvas tiempo-respuesta (CTR) (Figura 4.6.). Para ello se grafican los diferentes niveles de efecto en función del tiempo. Este tipo de análisis presenta ventajas desde el punto de vista del diseño experimental ya que comparativamente provee mayor información por unidad experimental que las CDR. Pese a ello es aún subutilizado en ecotoxicología.

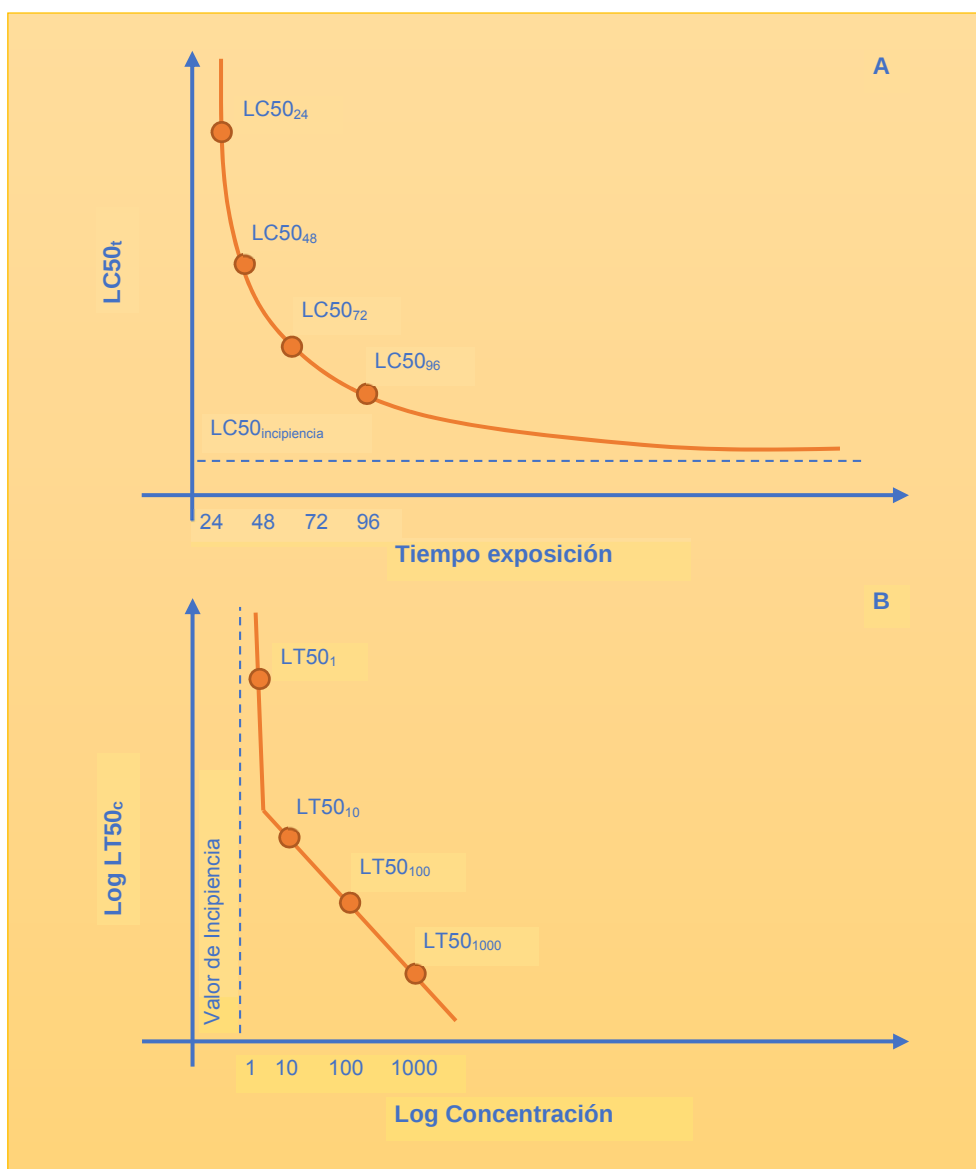


Figura 4.7: Valores de incipencia obtenidos a partir de las $LC50_t$ o los $LT50_c$.

Uno de los usos de las CTR es que permiten estimar el **tiempo hasta la muerte** (TTD). Para ello diferentes modelos son posibles como el de Litchfield, que plotea el logaritmo del tiempo de exposición vs las unidades Probit correspondientes a cada mortalidad observada a los diferentes tiempos. De tal forma puede obtenerse el **tiempo letal 50** (LT50) o **tiempo medio hasta la muerte** (MTTD).

El valor de **incipiencia** es el umbral de concentración o tiempo a partir de la cual se comienzan a observar efectos adversos. Es común en ecotoxicología expresar el valor de incipencia en términos de la LC_{50} (Figura 4.7.A), a partir de graficar las LC_{50} obtenidas a diferentes tiempos de exposición. La asíntota de la función que se obtiene es la **LC_{50} de incipencia** que corresponde con el valor límite al que tendería dicho parámetro a tiempo infinito ($LC_{50_{\infty}}$). Ese valor indicaría la concentración por debajo de la cual el 50% de los individuos vivirán indefinidamente sin padecer los efectos letales que induce la sustancia. Menos utilizado, es el valor de incipencia estimado a partir de la $LT50$ (Figura 4.7.B). En este caso se obtiene graficando el logaritmo de la concentración vs. el logaritmo de la $LT50$ obtenida a diferentes concentraciones.

Tipos de efectos inducidos por los contaminantes

Las respuestas tóxicas pueden ser diferenciadas según la proximidad entre el sitio de exposición química y el sitio o sitios de acción molecular. Los **efectos locales** son aquellos que ocurren donde el tóxico y el sistema biológico primero hacen contacto. Tales efectos son producidos por la ingestión de sustancias tóxicas o la inhalación de materiales irritantes. Ejemplo de ello son sustancias altamente reactivas, como ácidos y bases fuertes. El cloro gaseoso al ser inhalado reacciona con el tejido pulmonar en el sitio de contacto, causando daño e hinchazón de los pulmones, con consecuencias posiblemente fatales, a pesar de que muy poca sustancia química se absorbe en el torrente sanguíneo. Por otro lado, los **efectos sistémicos** son aquellos que requieren la absorción y distribución del tóxico desde su punto de entrada a un sitio distante donde se producen los efectos nocivos. La mayoría de las sustancias, producen este tipo de efecto. En algunos casos, las sustancias pueden causar efectos locales y sistémicos simultáneamente. La mayoría de los químicos que producen toxicidad sistémica no causan una toxicidad de similar grado en todos los órganos; en cambio, generalmente provocan su mayor toxicidad en solo uno o dos órganos. Estos sitios se conocen como **órganos diana** y no necesariamente son los sitios donde la sustancia química alcanza la mayor acumulación. Esto es particularmente cierto para sustancias lipofílicas como el DDT que se acumulan más en el tejido adiposo que en el sistema nervioso donde generan el efecto tóxico. Este hecho ha sido especialmente relevante, por ejemplo, para las aves migratorias que durante los meses de verano acumulaban el insecticida en la grasa corporal sin manifestar ningún efecto adverso. Luego, al quemar las grasas durante la migración en el otoño, el DDT era liberado a la sangre, acumulándose ahora en el cerebro y el sistema reproductivo, lo que causaba en las aves efectos letales agudos por neurotoxicidad y disminución del éxito reproductivo, respectivamente. Entre los efectos sistémicos, no sólo deben considerarse aquellos ocurridos sobre órganos diana sino también los efectos tóxicos **no dirigidos a órganos diana** específico como los generados por sustancias carcinogénicas que pueden actuar sobre diferentes órganos de manera inespecífica.

La **alometría** es un factor importante que suele modificar los efectos inducidos por los contaminantes, dado que al aumentar el tamaño se modifican las relaciones superficie/volumen y por tanto las tasas de incorporación y eliminación y por lo tanto la acumulación de las sustancias. Se ha observado que es posible establecer para una misma especie una relación entre la toxicidad de una sustancia y el peso del organismo de acuerdo a la ecuación:

$$\log LC_{50} = \log a + b \times \log peso$$

O lo que es igual:

$$LC_{50} = a \times peso^b$$

La exposición repetida a un químico puede reducir la respuesta tóxica, mediante un proceso llamado **tolerancia o aclimatación**. La **tolerancia disposicional** se da cuando la cantidad de una sustancia que alcanza el sitio de acción disminuye con el tiempo, por ejemplo, por activación del sistema de detoxificación, reduciendo la respuesta en el tejido. Por otra parte, la **tolerancia**

química o celular puede resultar de una menor disponibilidad de receptores y/o mediadores (por ejemplo, neurotransmisores) producto, por ejemplo, de una inhibición de la expresión de los mismos. En particular, cuando sustancias relacionadas estructuralmente causan una respuesta disminuida, ocurre lo que se conoce como **tolerancia cruzada**.

Por otra parte, mientras algunos efectos son **reversibles**, otros son **irreversibles**. La probabilidad de que el efecto se revierta una respuesta tóxica depende en gran medida de la capacidad de un tejido lesionado para adaptarse, reparar y regenerarse. Por lo tanto, para tejidos como el hígado y el tracto gastrointestinal que tienen una alta capacidad de regeneración, muchas lesiones son reversibles. Existen límites para esta capacidad de reparación, y las dosis muy altas pueden abrumar esta respuesta adaptativa que conduce a la pérdida permanente de la función y la insuficiencia hepática potencialmente mortal.

De acuerdo a la velocidad con la que las sustancias actúan luego de la exposición, los efectos pueden dar lugar a una **toxicidad inmediata**, generalmente cuando se trata de altas dosis de estos químicos que pueden tener efectos rápidos en los sistemas cardiovascular, respiratorio y neurológico que culminan en la muerte en minutos. Por otro lado, otras sustancias pueden producir **toxicidades retardada** ya que pueden manifestarse luego de meses o años de ocurrida la exposición, esto es característico de sustancias carcinogénicas.

En cuanto a la duración y la frecuencia de las exposiciones, en *toxicología*, los efectos se diferencian en agudos, subagudos, subcrónicos y crónicos. Las exposiciones agudas se consideran como exposiciones únicas, a una concentración de la sustancia relativamente elevada y de una duración no mayor a 24h. Las demás, se consideran como exposiciones repetidas a concentraciones generalmente más bajas, en el caso de las subagudas por un período de hasta 1 mes, las subcrónicas hasta 3 meses y las crónicas por periodos de más de 3 meses hasta años.

En *ecotoxicología*, dada la diversidad de organismos que se utilizan en los ensayos de toxicidad, tal clasificación no es tan precisa y dependerá mucho de la duración del ciclo de vida de cada especie. Suele considerarse una evaluación de **efectos agudos** aquellos que se manifiestan en horas, generalmente analizados a 24h, 48h y hasta 96h. En el caso de los **efectos crónicos** las duraciones son mayores, considerándose un periodo no menor al 10% de la duración del ciclo de vida de la especie utilizada. Aunque, muchas veces los límites entre las exposiciones agudas y crónicas suelen ser borrosos, los efectos tóxicos en cada caso suelen ser bien distintos. Por ejemplo, en organismos acuáticos, los efectos agudos inducidos por el Cd suelen estar relacionados principalmente al desbalance iónico del Ca^{+2} en el plasma que producen hipocalcemia que, a su vez, provocan la disfunción cardíaca que conduce a la muerte de los individuos. Por otro lado, los efectos crónicos se asocian principalmente a la interferencia con la señalización celular que puede, por ejemplo, provocar la disrupción del sistema endócrino.

Para varios organismos acuáticos, los bioensayos crónicos suelen tener una duración de 28d. Sin embargo, la duración varía mucho entre especies, por ejemplo, para la OECD, la duración de un ensayo crónicos con abejas (*Apis mellífera*) tiene una duración de 10d mientras que con roedores tiene una duración de hasta 12 meses.

Dada la dificultad y el costo de realizar ensayos tan prolongados la USEPA, por ejemplo, considera la estimación de concentraciones crónicas seguras a partir de ensayos agudos con estadios de vida críticos. Por ejemplo, la estimación de la **concentración máxima aceptable** para un tóxico (MATC) a partir de bioensayos con estadios tempranos (ELS), mediante la exposición de embriones durante la incubación y las larvas durante 30 días después de la eclosión. Sin embargo, es importante tener presente que la relevancia de dichos ensayos ha sido cuestionada, dado que no siempre los estadios más tempranos son los más críticos y en estudios ecológicos las edades con mayor valor reproductivo pueden ser de las de mayor importancia y ciertos contaminantes, como los disruptores endócrinos, afectarlas específicamente.

Dado que en ecotoxicología la disponibilidad de información sobre toxicidad aguda suele ser mucho mayor que para crónica, la USEPA ha propuesto el cálculo de la **relación agudo crónico** (ACR) como:

$$ACR = \frac{LC_{50}}{MATC}$$

Donde, MATC (concentración máxima aceptable) se obtiene a partir de la ecuación:

$$MATC = \sqrt{NOEC \times LOEC}$$

En la cual, LOEC y NOEC son la concentración de no efecto y la más baja que produce efecto para puntos finales crónicos. En este contexto, la relación ACR puede ser utilizada como un factor de corrección de datos de toxicidad aguda para estimar las MATC asociada a niveles de efectos crónicos.

Efecto de las mezclas

Por lo general en el ambiente los contaminantes no se encuentran solos, sino que se hallan acompañados de muchos otros contaminantes. Incluso, en los productos comerciales se encuentran en formulaciones que contienen varias sustancias juntas. Por tanto, comprender la toxicidad de las mezclas es un tema de relevancia en la ecotoxicología. Cuando en una mezcla binaria una sustancia se encuentra a niveles tóxicos y la otra a una concentración muy por debajo del nivel al que induce toxicidad, pero incrementa la toxicidad de la primera, se dice que la mezcla causa una **potenciación** del efecto tóxico. Un ejemplo clásico es la potenciación de la neurotoxicidad inducida por los piretroides al combinarlos con butóxido de piperonilo (BOP). Ello se debe a que el BOP es un fuerte inhibidor del citocromo P450 que contribuye a la detoxificación de los piretroides y por tanto incrementa el tiempo medio de residencia del insecticida en los tejidos y por tanto su concentración interna. Si ambas sustancias en la mezcla binaria se presentan a concentraciones en las que despliegan efectos tóxicos, se dirá que la mezcla causa **aditividad**, **sinergia** o **antagonismo** de los efectos tóxicos, cuando la mezcla posea un efecto igual, mayor o menor a la suma de los efectos causados por las dos sustancias por separado, respectivamente. El antagonismo puede ser **funcional**, si las dos sustancias inducen efectos opuestos en una función bioquímica o fisiológica, **químico**, si las dos sustancias reaccionan entre sí para dar un producto menos tóxico, **disposicional** si la interacción afecta la

absorción, distribución, biotransformación y eliminación de las sustancias en la mezcla, o de **receptor** cuando ambas sustancias compiten por el mismo receptor.

Para comparar la toxicidad de dos sustancias diferentes en una mezcla es útil expresar los efectos que inducen en **unidades tóxicas** (TU) que se obtiene como la fracción de la $LC50_{(t)}$ o más estrictamente del valor de incipencia ($LC50_{(t\infty)}$) obtenido según la fórmula:

$$TU = \frac{\text{Concentración de exposición}}{LC50_{t\infty}}$$

Por consiguiente, si las $LC50_{(t\infty)}$ de la sustancia A y B son 2 y 5 mg/L, respectivamente, para obtener una mezcla que posea 0,5 UT de A y 0,5 UT de B debiera tener 1 y 2,5 mg/L de A y B respectivamente. Si el efecto de la mezcla fuere aditivo, el efecto hallado en dicha mezcla debiera ser el equivalente a 1 UT, ello es 50% de mortalidad. Si obtuviera una mortalidad mayor ($UT_{mezcla} > 1$) entonces el efecto sería sinérgico y si fuera menor al 50% ($UT_{mezcla} < 1$) el efecto sería antagónico. Ello se puede calcular mediante el **índice de aditividad** que se calcula del siguiente modo:

$$S = \frac{LC50_{Am}}{LC50_A} + \frac{LC50_{Bm}}{LC50_B}$$

Donde, $LC50_{Am}$ y $LC50_{Bm}$ son las concentraciones de A y B en la mezcla que produce el 50% de mortalidad y $LC50_A$ y $LC50_B$ las concentraciones de A y B que producen el 50% de mortalidad de forma separada. La suma de las contribuciones tóxicas puede graficarse como se muestra en la [Figura 4.8](#).

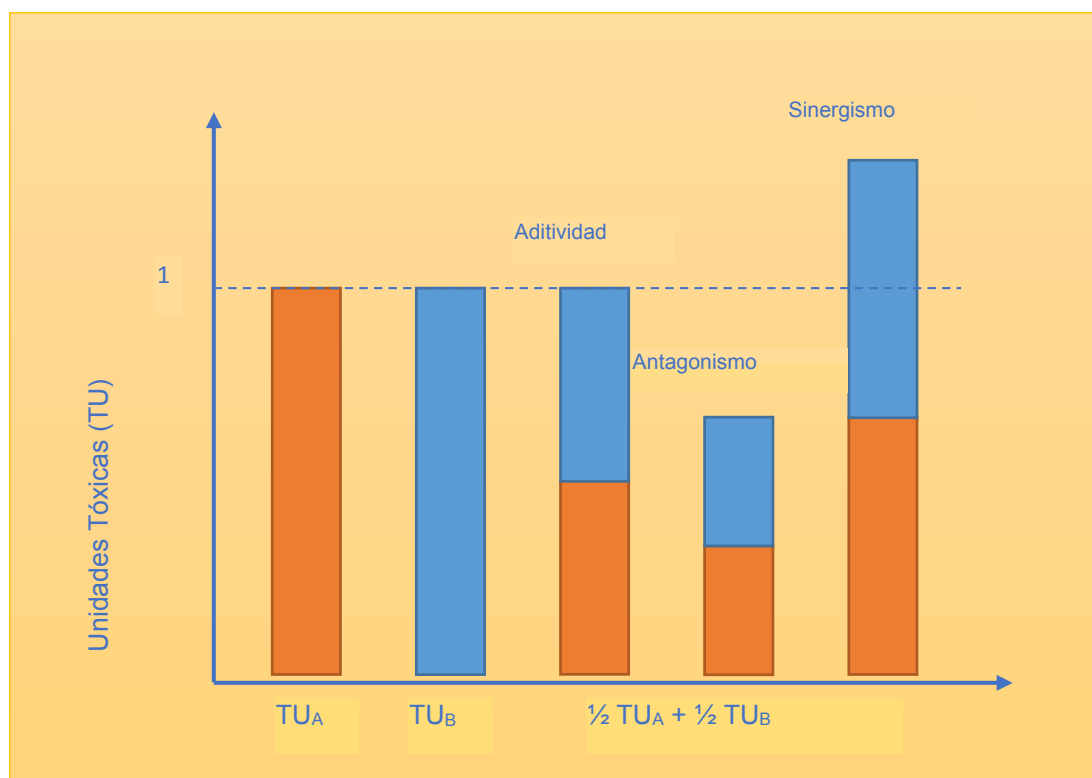


Figura 4.8: Suma de las contribuciones tóxicas en una mezcla binaria

Otra forma de analizar la aditividad en las mezclas es a través del gráfico de isobola (Figura 4.9.). En el mismo se compara cuantas unidades tóxicas de cada sustancia en la mezcla binaria son necesarias para obtener una respuesta de una unidad tóxica (ej. 50% mortalidad) en la mezcla y se compara contra el caso que la interacción en la mezcla sea de tipo aditivo representado por la diagonal del gráfico. En caso de caer por debajo de dicha diagonal la mezcla será sinérgica y si cae por encima de la misma será antagonista.

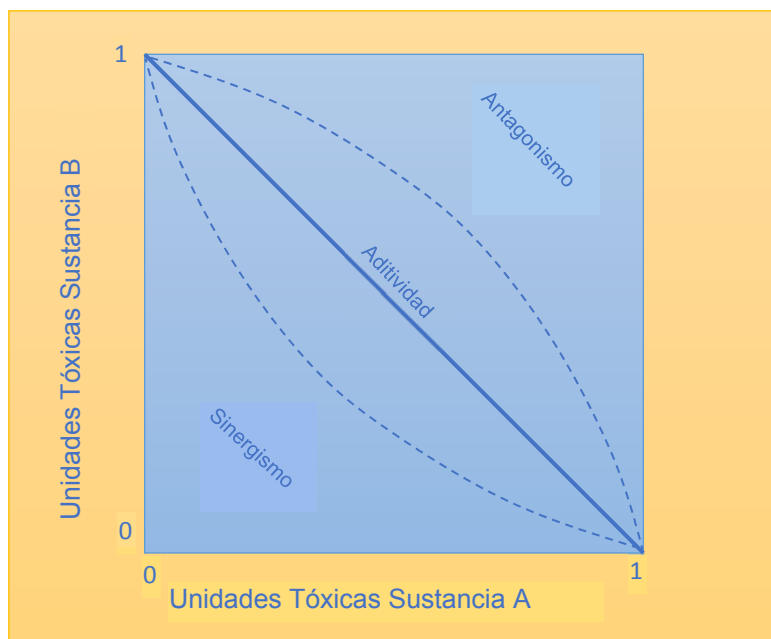


Figura 4.9: Gráfico de Isobola

Dado que la relación entre concentración y efecto (ej. letal) no es lineal si no que sigue en general una reacción sigmoidea, cuando se trabaja lejos de la LC50, suele ser más apropiado sumar los efectos en términos del logaritmo de la concentración y las unidades Probit para linealizar la relación.

Un abordaje conveniente, es evaluar el efecto de las mezclas de acuerdo al modo de acción tóxica de las diferentes sustancias. En función de ello se han propuesto diferentes modelos que contribuirían a explicar la interacción de las sustancias en las mezclas para inducir los efectos adversos. El modelo de adición de concentraciones (CA), el modelo de acción independiente (IA) y el modelo de interacción simple (SI). En el modelo CA se asume que las sustancias poseen el mismo modo de acción y que su acción conjunta es de una forma aditiva luego de normalizar la toxicidad en función de la potencia de cada una. Por consiguiente, luego de dicha normalización, la toxicidad de la mezcla puede predecirse a partir de la sumatoria de las concentraciones normalizadas de cada tóxico en la mezcla según la siguiente ecuación:

$$ECx_{mix} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{p_i}{ECx_i} \right)^{-1}$$

Donde x : es la proporción del efecto observado, p_i : la proporción de la sustancia i en la mezcla, n : el número de sustancias en la mezcla, y ECx_i : la concentración de la sustancia i que produce el efecto x . En general la fórmula se expresa en términos de TUs, como sigue:

$$TUs = \left(\sum_{i=1}^n \frac{C_i}{ECx_i} \right)^{-1}$$

Donde, C_i es la concentración de la sustancia i en la mezcla.

En el modelo de IA, se asume que las sustancias poseen un modo de acción diferente y por tanto que su acción es independiente. Conceptualmente, este modelo es un enfoque estadístico para predecir la probabilidad de que ocurra uno de múltiples eventos posibles. En este caso, la toxicidad de la mezcla se estima como:

$$ECx_{mix} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - ECx_i)$$

Donde ECx_{mix} : es el efecto esperado en la mezcla y ECx_i el efecto esperado a partir de la sustancia i .

En el modelo de SI, se asume una interacción entre las sustancias gobernada por el efecto de potenciación descrito previamente. Una sustancia a una concentración mucho menor a la que causa toxicidad incrementa la acción tóxica de otra sustancia evaluada a concentraciones a las que sí produce efecto. En general no existe un modelo formal para evaluar SI, si no que tales interacciones se descubren a partir del apartamiento que posee el comportamiento de estas mezclas respecto de los modelos anteriores. Para ello se suele calcular la proporción de desviación del modelo (MDR) de acuerdo a:

$$MDR = \frac{ECx_{mix} \text{ esperada}}{ECx_{mix} \text{ observada}}$$

Un concepto ampliamente utilizado para comparar la toxicidad relativa de diferentes compuestos que poseen el mismo modo de acción (ej. dioxinas y PCBs o estrógenos) es el de toxicidad equivalente (TEQ) que se define como la toxicidad proporcional de un compuesto dado de la familia respecto a otro que se utiliza como referencia, por ejemplo, para las dioxinas la 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina o para los estrógenos el estradiol (E_2). Para ello se puede calcular el factor de toxicidad equivalente como sigue:

$$TEF = \frac{ECx_i}{ECx_{ref}}$$

Donde, ECx_i : es la concentración efectiva del compuesto i y ECx_{ref} es la concentración efectiva del compuesto de referencia. Por ejemplo, el TEF de la 1,2,3,7,8-pentacloro-dibenzo-p-dioxina es de 0,5, ello quiere decir que su afinidad por el receptor arilo (AhR) es la mitad que la de la dioxina de referencia y por tanto se necesitará el doble de concentración para inducir la misma respuesta. Por consiguiente, para estimar su contribución a la inducción del receptor en una muestra, su concentración deberá multiplicarse por 2.

Vías de efectos adversos

La ecotoxicología requiere del desarrollo de un marco conceptual dentro del cual los datos y el conocimiento recopilados en diferentes niveles de organización biológica puedan ser sintetizados de una manera simple que puedan ser fácilmente incorporados en la evaluación de riesgo ecológica. Un paradigma que ha surgido recientemente para dilucidar los vínculos entre respuestas observadas a diferentes niveles de organización es el concepto de "Vía de Efectos Adversos" (AOP). Sus inventores, Gary Ankley y colaboradores, lo ha definido como "una construcción conceptual que retrata el conocimiento existente sobre el vínculo entre un efecto iniciador molecular directo (por ejemplo, una interacción molecular entre un xenobiótico y una biomolécula específica) y un efecto adverso a un nivel de organización biológica relevante para la evaluación de riesgos". En el ámbito de la ecotoxicología y la evaluación del riesgo ecológico, la población es el nivel generalmente de mayor relevancia. El desarrollo del concepto de AOP ha incorporado principios como el de buenas prácticas para la armonización internacional de los enfoques y bases de datos y la integración de herramientas computacionales y de modelado. El marco conceptual (Figura 4.10.) intenta explicar de manera mecanística la relación entre la acción del contaminante a nivel de su interacción molecular (Ancla 1) y los efectos adversos inducidos a nivel del organismo o de la población (Ancla 2).



Figura 4.10: Marco conceptual de las Vías de Efecto Adverso (AOPs)

Bibliografía

- Ashauer, R., O'Connor, I., Hintermeister, A., Escher, B.I., 2015. Death Dilemma and Organism Recovery in Ecotoxicology. *Environmental Science & Technology* 49, 10136-10146.
- Belden, J.B., Gilliom, R.J., Lydy, M.J., 2007. How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integrated environmental assessment and management* 3, 364-372.
- Carriquiriborde, P., Díaz, J., López, G.C., Ronco, A.E., Somoza, G.M., 2009. Effects of cypermethrin chronic exposure and water temperature on survival, growth, sex differentiation, and gonadal developmental stages of *Odontesthes bonariensis* (Teleostei). *Chemosphere* 76, 374-380.
- Carriquiriborde, P., Handy, R.D., Davies, S.J., 2004. Physiological modulation of iron metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low and high iron diets. *Journal of Experimental Biology* 207, 75-86.
- Carriquiriborde, P., Marino, D.J., Giachero, G., Castro, E.A., Ronco, A.E., 2012. Global metabolic response in the bile of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*, Pisces) sublethally exposed to the pyrethroid cypermethrin. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76, 46-54.
- Carriquiriborde, P., Ronco, A., 2002. Sensitivity of the neotropical teleost *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atherinidae) to chromium(VI), copper(II), and cadmium(II). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 294-301.
- Escher, B.I., Hermens, J.L.M., 2002. Modes of action in ecotoxicology: Their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4201-4217.
- Klaassen, C.D., 2019. Casarett and Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons (Ninth Edition) McGraw-Hill Education, New York.
- López Aca, V., Gonzalez, P.V., Carriquiriborde, P., 2018. Lethal and sublethal responses in the fish, *Odontesthes bonariensis*, exposed to chlorpyrifos alone or under mixtures with endosulfán and lambda-cyhalothrin. *Ecotoxicology* 27, 968-979.
- Newman, M.C., 2015. *Fundamentals of Ecotoxicology The Science of Pollution* (4th). CRC Press, Boca Raton, FL.
- OECD, 2018. Test No. 452: Chronic Toxicity Studies, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 OECD, Paris, 18 pp doi:<https://doi.org/10.1787/9789264071209-en>.
- Paracampo, A., García, I., Mugni, H., Marrochi, N., Carriquiriborde, P., Bonetto, C., 2015. Fish assemblage of a Pampasic stream (Buenos Aires, Argentina): temporal variations and relationships with environmental variables. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 50, 145-153.
- Renner, R., 2004. Redrawing the Dose-Response Curve. *Environ. Sci. Technol.* 38, 00A-05A.
- USEPA, 2002. Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms, Fourth Edition. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, EPA-821-R-02-013, Washington, DC.

CAPÍTULO 5

Estrés oxidativo

José María Monserrat

*Las cosas tienen su forma en el tiempo. No apenas
en el espacio. Algunos bloques de mármol tienen
estatuas incrustadas en el futuro.*

ALAN MOORE, Watchmen

Conceptos generales

La vida aeróbica generó varios desafíos a los organismos en función de la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS) que pueden generar daño en diversas moléculas y, por consecuencia, en las funciones celulares. Existe una gran variedad de factores abióticos, incluyendo salinidad, temperatura, y gran cantidad de compuestos tóxicos que pueden alterar el balance entre la concentración de antioxidantes y pro-oxidante (Monserrat et al., 2007; Lushchak, 2011; Kütter et al., 2014; Lushchak, 2014), promoviendo la oxidación de biomoléculas y generando así una situación de estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 2015). Existen varias definiciones para el término de **estrés oxidativo**, las cuales dependen de conceptualizar claramente a lo que consideramos daño oxidativo. A la definición clásica, que considera el fiel de la “balanza” entre la concentración de antioxidantes y pro-oxidantes, con potencial generación de daño oxidativo, se le han sumado en los últimos tiempos conceptos más funcionales, que consideran el papel del estado redox en procesos celulares (Sies, 2015). Autores como Jones (2006), sin negar el modelo de la “balanza” y el potencial efecto en términos de daño oxidativo, considera al estrés oxidativo como una disrupción de la señalización redox. Esta visión trae como aspecto novedoso el hecho que la activación de mecanismos de apoptosis celular como los mediados por la ASK1 (“apoptosis-signaling kinase-1”) depende del estado redox. En particular, proteínas como la tioredoxina 2 (Trx2) se unen a la ASK1, inhibiendo el proceso apoptótico. Sin embargo, una condición altamente oxidante puede inducir la formación de puentes disulfuros de Trx2, promoviendo la liberación de la ASK1 y la activación de la vía apoptótica (Hansen et al., 2006). En este caso, la alteración funcional ya sería una evidencia de daño oxidativo, una concepción bastante diferente de la que considera apenas el aumento de biomoléculas (proteínas, lípidos, o ADN, entre otras) oxidadas como evidencia de este proceso.

Sistema de defensas antioxidantes

A lo largo del proceso evolutivo, la atmósfera terrestre se fue tornando paulatinamente más oxidante y fueron surgiendo procesos bioquímicos que permitieron una generación extremadamente más eficiente de ATP, asociados a la respiración mitocondrial. La “fuga” de una cierta proporción de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial al unirse al oxígeno forman el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Otras especies químicas, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxil ($HO^{\cdot}$) son también formados en el proceso reductivo del oxígeno para formación de agua en las células con metabolismo aeróbico (Banerjee, 2008). Así, varios mecanismos de defensa antioxidante se fueron generando para mantener las concentraciones de estas especies químicas en niveles compatibles con la vida. A modo de ejemplo, el radical $O_2^{\cdot-}$ es reducido a H_2O_2 y agua a través de la acción catalítica de la enzima superóxido dismutasa (SOD). El peróxido de hidrógeno, por su vez, puede ser reducido a agua por acción de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) o a agua y oxígeno por acción de la enzima catalasa (CAT) (Figura 5.1). La presencia de otras moléculas, muchas veces llamadas de antioxidantes no enzimáticos, completan el sistema de defensas antioxidantes. Los **antioxidantes no enzimáticos** pueden ser incorporados exógenamente por la dieta o a partir de la producción endógena. Dentro de los antioxidantes no enzimáticos exógenos cabe citar a las vitaminas C (ascorbato) y E (α -tocoferol) y también a moléculas como los β -carotenos y una grande diversidad de compuestos fenólicos presentes en plantas y frutos. Dentro de los generados en forma endógena es importante destacar al glutatión reducido (GSH), un tripéptido formado por residuos de glutamato, cisteína y glicina a través de la acción catalítica de dos enzimas: la glutamato cisteína ligasa (GCL) y la glutatión sintetasa (Dickinson y Forman, 2002) (Figura 5.1). También es importante el ácido lipoico, una molécula conocida por ser el co-factor de enzimas del ciclo de Krebs, pero que también posee propiedades antioxidantes, principalmente por la inducción de genes importantes en la defensa antioxidante y de detoxificación celular (Rochette et al., 2013).

La interacción que existe entre los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos es compleja y varias de estas son termodinámicamente posibles. A modo de ilustración, la hipótesis de sumidero de radicales (“radical sink hypothesis”) propuesta por Winterbourn (1993) considera una serie de reacciones en donde los radicales reaccionan con GSH generando finalmente anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que puede luego ser degradado a partir de la acción enzimática de la SOD. En la visión de esta autora, el anión superóxido sería el producto final, resultado de la transferencia de electrones de radicales generados por el metabolismo celular al oxígeno o, en forma indirecta, por medio de la reacción de estos radicales con GSH. De esta forma, tanto la producción de un antioxidante como el GSH como la actividad catalítica de la SOD son necesarias para mantener un estado celular reducido (Winterbourn, 1993).

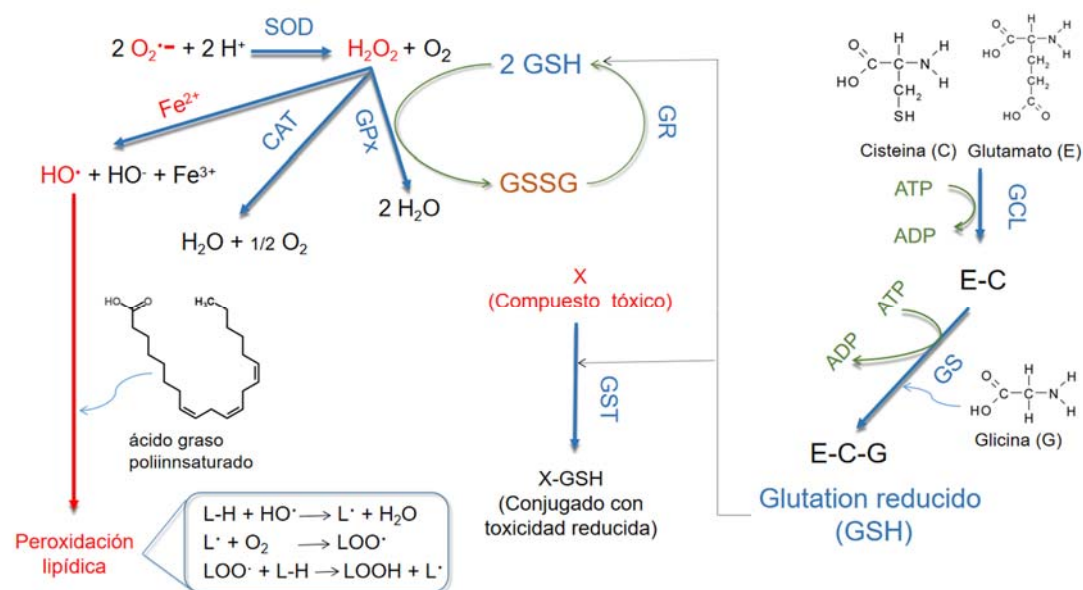


Figura 5.1. Ejemplo de algunas defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. Se puede observar la degradación del radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) por la enzima superóxido dismutasa (SOD), que genera como producto peróxido de hidrógeno (H_2O_2) el cual a su vez es degradado por enzimas como la catalasa (CAT) o la glutatión peroxidasa (GPx). Otras enzimas, como la glutatión-S-transferasa (GST), catalizan reacciones de detoxificación celular, conjugando metabolitos tóxicos (endógenos o exógenos) con un antioxidante no enzimático, el glutatión reducido (GSH), generando un producto más polar y menos tóxico. El GSH es producido endógenamente a partir de la acción catalítica de dos enzimas: la glutamato cisteína ligasa (GCL) y la glutatión sintasa (GS). En la degradación del H_2O_2 por la GPx, se utiliza el poder reductor del GSH que se oxida a glutatión disulfuro (GSSG), molécula que puede ser reducida nuevamente a GSH por acción de la enzima glutatión reductasa (GR). La figura muestra la importancia de mantener los niveles intracelulares de H_2O_2 sobre control: esta molécula, en presencia de hierro libre (Fe^{2+}) genera la especie más reactiva, el radical hidroxilo ($HO^\bullet$). Este radical puede remover un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado (PUFA), promoviendo el proceso de peroxidación lipídica, una de las variables comúnmente utilizadas para caracterizar daño oxidativo. El recuadro inferior resume este proceso: un PUFA (L-H) en presencia de $HO^\bullet$ genera un radical lipídico ($L^\bullet$) que, en un ambiente aeróbico, genera un lipoperoxi-radical ($LOO^\bullet$) el cual irá a perpetuar el proceso de peroxidación lipídica por medio de la remoción de otro átomo de hidrógeno de otra molécula de PUFA para generar un hidropéroxido lipídico (LOOH), una molécula estable que comúnmente es utilizada para evaluar daño oxidativo lipídico.

Medidas de capacidad antioxidante total

Como fue dicho previamente, el sistema antioxidante está constituido por diversas moléculas y enzimas que conforman una red compleja de interacciones, lo cual genera problemas a la hora de medir el estado antioxidante de células, tejidos o, incluso, organismos, ya que en cualquier investigación se evaluará un número limitado de antioxidantes (Winston et al., 1998; Regoli y Winston, 1999; Gorbi y Regoli, 2003; Amado et al., 2009). Muchas veces también ocurre que los antioxidantes medidos en un estudio difieren de los medidos en otro, lo que dificulta la comparación de los resultados. Finalmente también debe considerarse que si en un estudio se observa, por ejemplo, que una condición experimental aumentó la actividad de la GPx (o su expresión) y simultáneamente disminuyó la actividad (o su expresión) de la catalasa, resultará complicado decidir si el factor en estudio indujo o no una respuesta antioxidante que afecta los niveles de H_2O_2 .

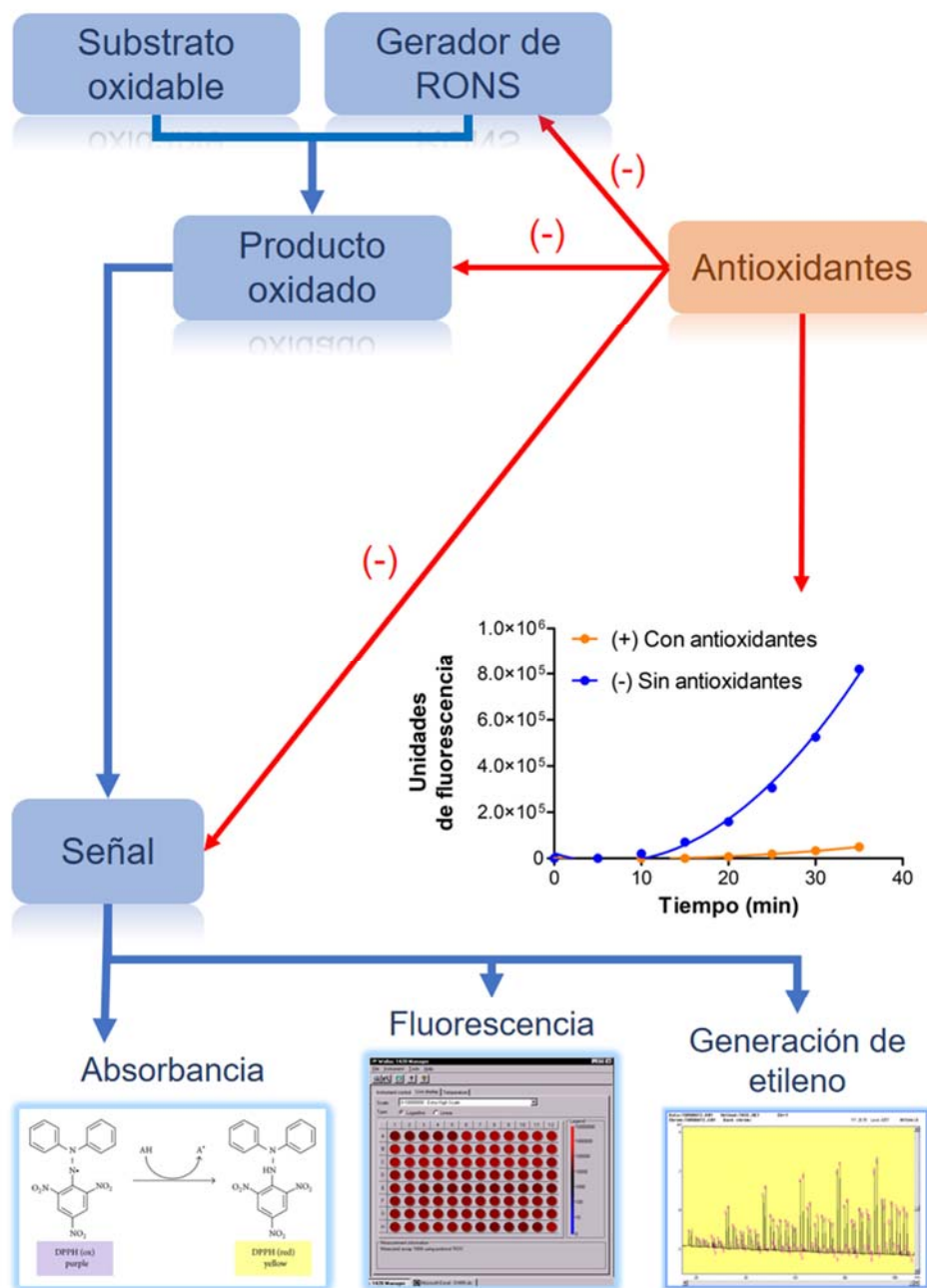


Figura 5.2. Diagrama de flujo para la determinación de la capacidad antioxidante total, utilizando diferentes tipos de substratos oxidables que generan variados tipos de señal que pueden ser registrados. RONS: especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Las flechas con (-) indican inhibición del proceso al cual ellas apuntan. En la figura menor puede observarse la generación de fluorescencia de un producto oxidado en presencia y en ausencia de un compuesto antioxidante.

Teniendo en cuenta este problema, una estrategia ha sido el desarrollo de metodologías para medir la capacidad antioxidante, incluyendo tanto a las defensas no enzimáticas como a las enzimáticas, obteniéndose de esta forma un resultado que estime la capacidad antioxidante global contra una determinada especie reactiva, generalmente radicalar (Regoli y Winston, 1999; Gorbi y Regoli, 2003). Existen varios métodos para determinar la capacidad antioxidante total y casi todos ellos se basan en el mismo principio y componentes (Figura 5.2): (a) la generación *in vitro* de algún tipo específico de RONS; (b) un substrato oxidable que reaccionará con los RONS; (c)

un producto oxidado generado después de reaccionar el sustrato oxidable con los RONS; (d) una señal emitida por el producto oxidado; (e) una señal emitida luego de los pasos (a)-(d) en presencia de una muestra biológica que se presume que tiene actividad antioxidante; y (f) la comparación de los resultados obtenidos en (d) y (e). La lógica por detrás de este principio es asumir que los antioxidantes presentes en la muestra biológica deberán interceptar y/o degradar los RONS y, como consecuencia, será generada una menor cantidad de producto oxidado, reduciendo de esta forma la intensidad de la señal. Los diferentes métodos utilizados para medir la capacidad antioxidante total miden distintos tipos de señales, incluyendo absorbancia, fluorescencia, liberación de etileno, etc. Es muy importante también mencionar que el potencial de reducción del RONS (y, por ende, su reactividad) generado puede diferir mucho entre cada uno de los métodos utilizados, lo que significa que la interpretación y comparación entre los distintos métodos difícilmente será simple e incluso posible.

Si bien las medidas de capacidad antioxidante total parecen tener ventajas frente a los problemas antes enunciados, su uso no está exento de problemas y críticas. El hecho ya comentado de que el sistema antioxidante forma una trama compleja de reacciones en donde varias moléculas y enzimas intervienen hace que muchas veces no se observen respuestas en la capacidad antioxidante de organismos que, por ejemplo, fueron muestreados de un local no impactado y de otro impactado o entre organismos de un grupo control cuando comparados con otros expuestos a diferentes tipos de agentes tóxicos. Esta situación ya ha sido relatada varias veces en la literatura y puede ser interpretada en el sentido de que la depleción de antioxidantes para afrontar una situación pro-oxidante puede ocurrir en paralelo con la inducción de antioxidantes, producto de la expresión de genes de la defensa antioxidante. Un ejemplo claro al respecto puede verse en el trabajo de Zanette et al. (2015), en donde el molusco *Balanus improvisus* fue muestreado en diferentes lugares, algunos con evidencias previas de estar impactados y no fue observada respuesta en términos de alteraciones de la capacidad antioxidante contra radicales peroxil. Aun así, varios otros trabajos han observado alteraciones en la capacidad antioxidante total frente a diversas condiciones experimentales.

En la [Tabla 5.1](#) son mostrados los resultados de trabajos que han medido la capacidad antioxidante total en organismos acuáticos considerando diferentes factores como intensidad de luz, suplementación con antioxidantes o carbohidratos, radiación UV, exposición a toxinas, entre otros. Otros factores como la temperatura también ejercen influencia en la generación de RONS en organismos poiquilotérmicos. Por ejemplo, en la ostra *Pinctada fucatai* fue observado que el mayor contenido de carotenoides en estos organismos otorgaba a ellos mayor capacidad antioxidante y resiliencia frente al estrés térmico, reduciendo la inducción de peroxidación lipídica, una variable comúnmente medida para caracterizar una situación de estrés oxidativo (Meng et al, 2017). Otros factores, no tan estudiados, como la intensidad de luz o el uso de sistemas de cultivo intensivo con bioflocos (BFT) en acuicultura han demostrado modular la capacidad antioxidante total en moluscos y crustáceos, respectivamente (da Silva Martins et al., 2015; Xialong et al., 2016).

Tabla 5.1. Estudios con organismos acuáticos bajo diferentes condiciones experimental que han utilizado medidas de capacidad antioxidante total.

Especie (órgano/fluido)	Factor analizado	Método	Efecto observado	Referencia
Molusco <i>Haliotis discus hanai</i> (hepatopáncreas)	Intensidad de luz	Capacidad reductora de ión férrico (FRAP)	Elevación del FRAP a la mayor intensidad lumínica	Xialong et al. (2016)
Anfípodo <i>Gammarus wilkitzki</i> (organismo entero)	Radiación UV	Capacidad de “scavenging” total contra oxiradicales (TOSC)	Reducción del TOSC en los organismos expuestos a UV	Krapp et al. (2009)
Pez <i>Mylopharyngodon piceus</i> (hígado)	Dieta elevada en carbohidratos (HCHO)	FRAP	Menor valor de FRAP hepático en peces alimentados con la dieta HCHO	Zhou et al. (2017)
Camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> (músculo)	Comparación entre camarones cultivados en sistema de bioflocos (BFT) con camarones cultivados en agua salina sin bioflocos	Capacidad antioxidante contra peroxi radicales	Aumento de la capacidad antioxidante en músculo de camarones criados en sistema BFT	da Silva Martins et al. (2015)
Pez <i>Cyprinus carpio</i> (músculo)	Suplementación con ácido lipoico en la dieta	Capacidad antioxidante contra peroxi radicales	Mayor capacidad antioxidante en músculo de carpas suplementadas con ácido lipoico	Enamorado et al. (2015)
Pez <i>Jenynsia multidentata</i> (bránquias y cerebro)	Exposición a la hepatotoxina microcistina	Capacidad antioxidante contra peroxi radicales	Menor capacidad antioxidante en peces expuestos a la toxina	Amado et al. (2009)

Mecanismos de inducción de la capacidad antioxidante total

Aun teniendo en claro que existen miríadas de moléculas y enzimas que se encuentran interactuando y, por ende, generando variaciones en la capacidad antioxidante total, podríamos plantearnos si existen factores clave en su regulación. Autores como Regoli y Winston (1998) han considerado que el método propuesto por ellos -TOSC- para dosar la capacidad de “scavenging” total contra oxiradicales (como, por ejemplo, peroxi-radicales) depende de la concentración de GSH. Amado et al. (2009) han observado un resultado equivalente, ya que la adición de GSH a extractos de hígado de pez resultó en un aumento de la capacidad antioxidante contra peroxi-radicales. De esta forma, es importante analizar los mecanismos que controlan los niveles de GSH en las células. Como ya fue dicho, la síntesis de este antioxidante es efectuada por dos enzimas: la glutamato cisteína ligasa (GCL) y la glutamato sintase (GS), en ambos casos con gasto de ATP (Figura 5.1). La enzima GCL es una enzima dimérica, con una subunidad catalítica (GCLc) y otra regulatoria (GCLr). Varios factores afectan la actividad de la GCL, incluyendo el estado redox celular y la modificación covalente por fosforilación en la GCLc (Sun et al., 1996; White et al., 2003; Toroser et al., 2006). Por otro lado, existe un control transcripcional de los genes que codifican para las dos subunidades de esta enzima, efectuado por el factor Nrf2 (Suh et al., 2004).

Normalmente, la proteína Nrf2 forma un complejo con un homo dímero de la proteína citosólica Keap 1 (Kansanen et al., 2013), impidiendo su migración al núcleo celular (Nguyen et al., 2004). Sin embargo, algunos antioxidantes como, por ejemplo, el ácido lipoico y la quercetina, facilitan la disociación del complejo Nrf2-Keap1 (o la formación de este), promoviendo su migración al núcleo para inducir la expresión de genes importantes en la respuesta antioxidante enzimática y no enzimática, incluyendo aquellos que codifican para la GCLr y la GCLc (Koriyama et al., 2013; Ji et al., 2015). De esta forma, y aunque es extremadamente difícil asociar de forma unívoca el incremento de la capacidad antioxidante total a un subconjunto de antioxidantes específicos, algunos métodos son sensibles a un aumento en la concentración de GSH. Bajo esta perspectiva, es esperado que el uso de antioxidantes que modulen la estabilidad del complejo Nrf2-Keap1 o su formación deberían alterar la capacidad antioxidante total.

De hecho, y como mostrado en la [Tabla 1](#), Enamorado et al. (2015) encontró mayor capacidad antioxidante en músculo de la carpa común *Cyprinus carpio* después de ser alimentada durante cuatro semanas con una dieta enriquecida con ácido lipoico. En el mismo trabajo fue observado en el músculo un aumento significativo de GSH en la tercera semana del experimento, una respuesta que era esperada en función del efecto regulador del ácido lipoico en la expresión de los genes que codifican para la enzima GCL. La mención previa del gasto de ATP en la síntesis de GSH, sumado a que la expresión aumentada de los genes asociados a la defensa antioxidante y de detoxificación celular debería aumentar el proceso traduccional, que es sumamente oneroso en términos de ATP para la célula, genera una pregunta importante: ¿la respuesta antioxidante no debería modular (activar) los procesos catabólicos de la célula (Sies, 2015)? Varias evidencias indican que esto es, de hecho, lo que ocurre. La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es un efector clave en la inducción de procesos catabólicos como la β -oxidación, la glicólisis y la

incorporación de glucosa por células musculares. Lo interesante es que el tratamiento de ratas con extractos ricos en antioxidantes ha demostrado, además de disminuir la concentración de especies reactivas de oxígeno y los marcadores de daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN, el aumento de la concentración de ATP mitocondrial, así como la actividad de la citrato sintasa, del ciclo de Krebs (Giamperi et al., 2017). De esta forma podemos pensar que una situación pro-oxidante genera una respuesta coordinada, en la cual no solamente los genes importantes para la defensa antioxidantes son reclutados sino también los procesos catabólicos necesarios para proveer el ATP requerido para esta respuesta. Esta situación podemos considerarla un caso particular de respuestas de los organismos frente a condiciones adversas, como postulado por Sokolova et al. (2012). Estas autoras postulan que el presupuesto energético de un organismo puede ser afectado frente a diferentes tipos de agentes estresores, incluyendo salinidad, temperatura y agentes químicos variados. En esta situación, el aumento en la inversión en energía en ítems de mantenimiento, asociados a síntesis de enzimas de detoxificación, reparo, antioxidantes, etc., inducirá una queda concomitante en otros aspectos del metabolismo del organismo, como reproducción y crecimiento. Desde una perspectiva de estrés oxidativo, el condicionamiento previo que pudiera tener un organismo, sea por una exposición previa o por haber un tratamiento previo con antioxidantes, debería aumentar la resiliencia de este frente a factores de estrés, al tiempo que la inducción previa de estas respuestas de mantenimiento debería minimizar los efectos sobre la reproducción o crecimiento.

Bibliografía

- Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R., Yunes, J.S., Monserrat, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*, 407, 2115-2123.
- Banerjee, R. (2008). *Redox metabolism and life*. En: Redox Biochemistry, R. Banerjee (Ed), John Wiley and Sons, pp. 1-9.
- da Silva Martins, A., Artigas Flores, J., Porto, C., Wasielesky Jr., W., Monserrat, J.M. (2015). Antioxidant and oxidative damage responses in different organs of Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) reared in a biofloc technology system. *Marine Freshwater and Behavioral Physiology*, 48, 279-288.
- Dickinson, DA., Forman, H.J. (2002). Cellular glutathione and cellular metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 64, 1019 – 1026.
- Enamorado, A.D., Martins, A.C., Flores, J.A., Tesser, M.B., Caldas, S.S., Primel, E.G., Monserrat, J.M. (2015). Biochemical responses over time in common carp *Cyprinus carpio* (Teleostei, Cyprinidae) during fed supplementation with α -lipoic acid. *Comparative Biochemistry and Physiology*, A 188, 9-16.
- Giamperi, F., Alvarez-Suarez, J.M., Cordero, M.D., Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T.Y., Afrin, S., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M., Astolfi, P., Rubini, C., Zizzi, A., Tulipani,

- S., Quiles, J.L., Mezzetti, B., Battino, M. (2017). Strawberry consumption improves aging-associated impairments, mitochondrial biogenesis and functionality through the AMP-activated protein kinase signaling cascade. *Food Chemistry*, 234, 464-471.
- Gorbi, S., Regoli, F. (2003). Total antioxidant scavenging capacity as an index of susceptibility to oxidative stress in marine organisms. *Comments in Toxicology*, 9, 303-322.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford. 4th ed.: Oxford University Press, 851 pp.
- Hanson, J.M., Go, Y-M., Jones, D.P. (2006). Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signalling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46, 215-34.
- Huang, Y., Ruan, G., Qin, Z., Li, H., Zheng, Y. (2017). Antioxidant activity measurement and potential antioxidant peptides from hydrolysates of novel continuous microwave-assisted enzymolysis of the *Scomberomorus niphonius* protein. *Food Chemistry*, 223, 89-95.
- Kansanen, E., Kuosmanen, S.M., Leinonen, H., Levonen, A-L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biology*, 1, 45-49
- Koriyama, Y., Nakayama, Y., Matsugo, S., Kato, S. (2013). Protective effect of lipoic acid against oxidative stress is mediated by Keap1/Nrf2-dependent heme oxygenase-1 induction in the RGC-5 cell line. *Brain Research*, 1499, 145-157.
- Krapp, R.H., Bassinet, T., Berge, J., Pampanin, D.M., Camus, L. (2009). Antioxidant responses in the polar marine sea-ice amphipod *Gammarus wilkitzkii* to natural and experimentally increased UV levels. *Aquatic Toxicology*, 94, 1-7.
- Kütter, M.T., Romano, L.A., Ventura-Lima, J., Tesser, M.B., Monserrat, J.M. (2014). Antioxidant and toxicological effects elicited by alpha-lipoic acid in aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C 162, 70-76.
- Ji, L-L., Sheng Y-C., Zheng, Z-Y., Shi, L., Wang, Z-T. (2015). The involvement of p62-Keap1-Nrf2 antioxidative signaling pathway and JNK in the protection of natural flavonoid quercetin against hepatotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, 85, 12-23.
- Jones, D.P. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxidant & Redox Signaling*, 8, 1865-1879.
- Lushchak, V.I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101, 13-30.
- Lushchak, V.I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164-175.
- Meng, Z., Zhang, B., Liu, B., Li, H., Fan, S., Yu, D. (2017). High carotenoids content can enhance resistance of selected *Pinctada fucata* families to high temperature stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 61, 211-218.
- Monserrat, J.M., Martinez, P.E., Geracitano, L.A., Amado L.L., Martins, C.M.G. Pinho, G.L.L., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A. (2007). Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C 146, 221-234.

- Naderi, M., Keyvanshokoo, Salati, A.P., Ghaedi, A. (2017). Combined or individual effects of dietary vitamin E and selenium nanoparticles on humoral immune status and serum parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under high stocking density. *Aquaculture*, 474, 40-47.
- Nguyen, T., Yang, C.S., Pickett, C.B. (2004). The pathways and molecular mechanisms regulating NRF-2 activation in response to chemical stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 37, 433-441.
- Regoli, F., Winston, G.W. (1999). Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 156, 96-105.
- Rochette, L., Ghibu, S., Richard, C., Zeller, M., Cottin, Y., Vergely, C. (2013). Direct and indirect antioxidant properties of α -lipoic acid and therapeutic potential. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57, 114-125.
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: impact in redox biology and medicine. *Archives of Medical and Biomedical Research*, 2, 146-50.
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A. (2012) Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*, 79, 1-15.
- Suh, J.H., Swapna, V.S., Dixon, B.M., Liu, H., Jaiswal, A.K., Liu, R.-M., Hagen, T.M. (2004). Decline in transcriptional activity of Nrf-2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 3381-3386.
- Sun, W.-M., Huang, Z.-Z., Lu, S.C. (1996). Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase by protein phosphorylation. *Biochemical Journal*, 320, 321-328.
- Toroser, D., Yarian, C.S., Orr, W.C., Sohal, R.S. (2006). Mechanisms of γ -glutamylcysteine ligase regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760, 233-244.
- White, C.C., Viernes, H., Krejsa, C.M., Botta, D., Kavanagh, T.J. (2003). Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Analytical Biochemistry*, 318, 175-180.
- Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, Jr. A.J., Fong, J.H., Blanchard, K.A. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 24, 480-493.
- Winterbourn, C.C. (1993). Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Radical Biology and Medicine*, 14, 85-90.
- Xialong, G., Xian, L., Meijie, L., Changbin, S., Ying, L. (2016). Effects of light intensity on metabolism and antioxidant defense in *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture*, 465, 78-87.
- Zanette, J., Monserrat, J.M., Bianchini, A. (2015). Biochemical biomarkers in barnacles *Balanus improvisus*: Pollution and seasonal effects. *Marine Environmental Research*, 103, 74-79.
- Zhou, C., Ge, X., Liu, B., Xie, J., Chen, R., Miao, L., Ren, M. (2017). Comparative study on the effect of high dietary carbohydrate on the growth performance, body composition, serum physiological responses and hepatic antioxidant abilities in Wuchan bream (*Megalobrama amblycephala*) and black carp (*Mylopharyngodon piceus* Richardson, 1846). *Aquaculture Research*, 48, 1020-1030.

CAPÍTULO 6

Neurotoxicidad

Ana Ferrari, Olga Liliana Anguiano

Introducción

La *neurotoxicidad* se define como cualquier efecto adverso sobre la química, estructura o función del sistema nervioso durante el desarrollo o en la madurez, inducido por un agente químico o físico (Ladefoged et al., 1995). Esta definición indica que el efecto adverso puede causar cambios estructurales en el sistema nervioso (SN), como por ejemplo pérdida de células específicas o puede causar efectos más sutiles relacionados con la comunicación nerviosa. La naturaleza del cambio inducido puede ser neuroquímica, morfológica o relacionada con la conducta y puede manifestarse transitoria o permanentemente. Es importante considerar que incluso pequeños cambios en la estructura o función del SN pueden tener profundas consecuencias para las funciones neurológicas, conductuales y las relacionadas con el cuerpo (Gilbert, 2012).

Los xenobióticos o sus metabolitos responsables de causar efectos adversos como resultado de la interacción directa con el SN se denominan agentes neurotóxicos. Numerosos compuestos químicos resultan tóxicos para el SN, entre ellos: metales, solventes orgánicos, plaguicidas, fármacos y toxinas naturales. La neurotoxicidad puede ocurrir en cualquier momento del ciclo de vida, desde la gestación hasta la senescencia, y sus manifestaciones pueden cambiar con la edad (National Research Council, 1992). Sin embargo, es importante considerar que el SN en desarrollo parece ser particularmente más vulnerable a los tóxicos que el maduro, por lo cual muchos de éstos deben ser considerados neurotóxicos del desarrollo (Costa y Pellacani, 2014).

Los efectos adversos producidos por los agentes neurotóxicos dependen de numerosos factores como son: las propiedades fisicoquímicas del agente químico, la vía de exposición y la dosis recibida y de otros parámetros relacionados con los individuos expuestos como edad, sexo, estado de salud general, factores dietéticos, sensibilidad individual, así como también las diferencias de susceptibilidad entre las diversas especies. Asimismo, se ha encontrado que el mecanismo de neurotoxicidad así como la sintomatología asociada puede variar incluso para un mismo compuesto dependiendo de si la exposición es aguda o crónica (Nava-Ruíz y Méndez-Armenta, 2011). Por otra parte, debe considerarse que luego de la exposición a altas dosis de algunos agentes neurotóxicos (como mercurio o arsénico) puede existir un período de latencia de días o semanas antes de que los cambios estructurales y funcionales en el SN se vuelvan evidentes (Spencer y Lein, 2014).

La exposición a agentes neurotóxicos puede ocasionar diferentes síntomas que incluyen: efectos motores (convulsiones, debilidad, temblor, espasmos, falta de coordinación, inestabilidad, parálisis, etc.), efectos sensoriales (cambios en el equilibrio, trastornos de la visión, del dolor, táctiles y auditivos, etc.), efectos cognitivos (confusión, problemas de memoria, del habla, de aprendizaje, etc.) y efectos sobre la personalidad y el estado de ánimo (excitabilidad, depresión, irritabilidad, nerviosismo, alucinaciones, etc.) (Harris y Blain, 2004; Gilbert, 2012).

Debido a que existe una exposición involuntaria a numerosos agentes neurotóxicos, la neurotoxicología se desarrolló como una disciplina en los años 1970s a fin de avanzar en el entendimiento de los efectos sobre el SN (Gilbert, 2012).

Biología básica del sistema nervioso

El sistema nervioso (SN) es el órgano más complejo en términos de estructura y función: coordina el comportamiento, al percibir y responder a estímulos externos es responsable de mediar la comunicación con el entorno externo; coordina las actividades de todos los demás sistemas de órganos y, por lo tanto, juega un papel esencial en el mantenimiento del equilibrio metabólico (Basu, 2015). La complejidad de los tipos celulares y de las funciones del SN junto con algunas características intrínsecas (por ejemplo, las neuronas maduras no se dividen y dependen en gran medida de la disponibilidad de oxígeno y glucosa), hacen que éste sea particularmente vulnerable a la presencia de diversos tóxicos (Harris y Blain, 2004).

Este sistema está anatómicamente dividido en sistema nervioso central (SNC) que comprende al encéfalo (cerebro, cerebelo y bulbo raquídeo) y la médula espinal y el sistema nervioso periférico (SNP) que incluye los ganglios y nervios por fuera del SNC. El SNC está aislado del resto del cuerpo por la barrera hematoencefálica (Spencer y Lein, 2014). El SNP está formado por todos los nervios que transmiten el impulso nervioso desde los receptores al SNC (nervios sensitivos o aferentes) y de éste a los órganos efectores, músculo o glándula (nervios motores o eferentes) y también por los ganglios nerviosos fuera del SNC. El SNP se puede dividir en los sistemas somático (voluntario) y autónomo (involuntario). El SN comienza a desarrollarse temprano en la gestación y continúa creciendo y cambiando, particularmente en los primeros años de la infancia y la niñez. Durante el desarrollo, el cerebro se organiza en áreas separadas pero interconectadas que controlan diferentes funciones (Gilbert, 2012), y son importantes los procesos de proliferación, diferenciación y migración celular (Spencer y Lein, 2014).

Diferentes tipos de células están presentes en el SN: neuronas, macroglia y microglia. Las neuronas son eléctricamente excitables y tienen una morfología única con cuerpo celular y prolongaciones constituidas por las dendritas y el axón. Los axones pueden variar en longitud dependiendo del tipo de neurona, pero generalmente la longitud es decenas o miles de veces mayor que el diámetro del cuerpo celular (National Research Council, 1992). A lo largo del axón se transmite el impulso nervioso hasta el terminal axónico. Las neuronas pueden comunicarse, por

transmisión sináptica mediante la liberación de neurotransmisores desde el terminal axónico hacia el espacio entre las células (hendidura sináptica), con cualquier célula que exprese receptores para los neurotransmisores que liberan. El neurotransmisor, generalmente, se almacena en vesículas sinápticas y luego se libera en respuesta a una señal que se transmite por el axón celular. Algunos neurotransmisores son: acetilcolina, glutamato, noradrenalina, ácido gama aminobutírico y dopamina. En la [Figura 6.1](#) se presenta la sinapsis colinérgica y el efecto de los inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) que será descripto detalladamente más adelante. Las neuronas son responsables de la recepción, integración, transmisión y almacenamiento de información. Se pueden clasificar como interneuronas, neuronas motoras, sensoriales y neuroendocrinas. Las neuronas motoras inervan las fibras musculares; las sensoriales monitorean los ambientes externos e internos del organismo, las neuronas neuroendocrinas provocan secreciones de las células glandulares y las interneuronas modulan las interacciones entre otras neuronas (National Research Council, 1992).

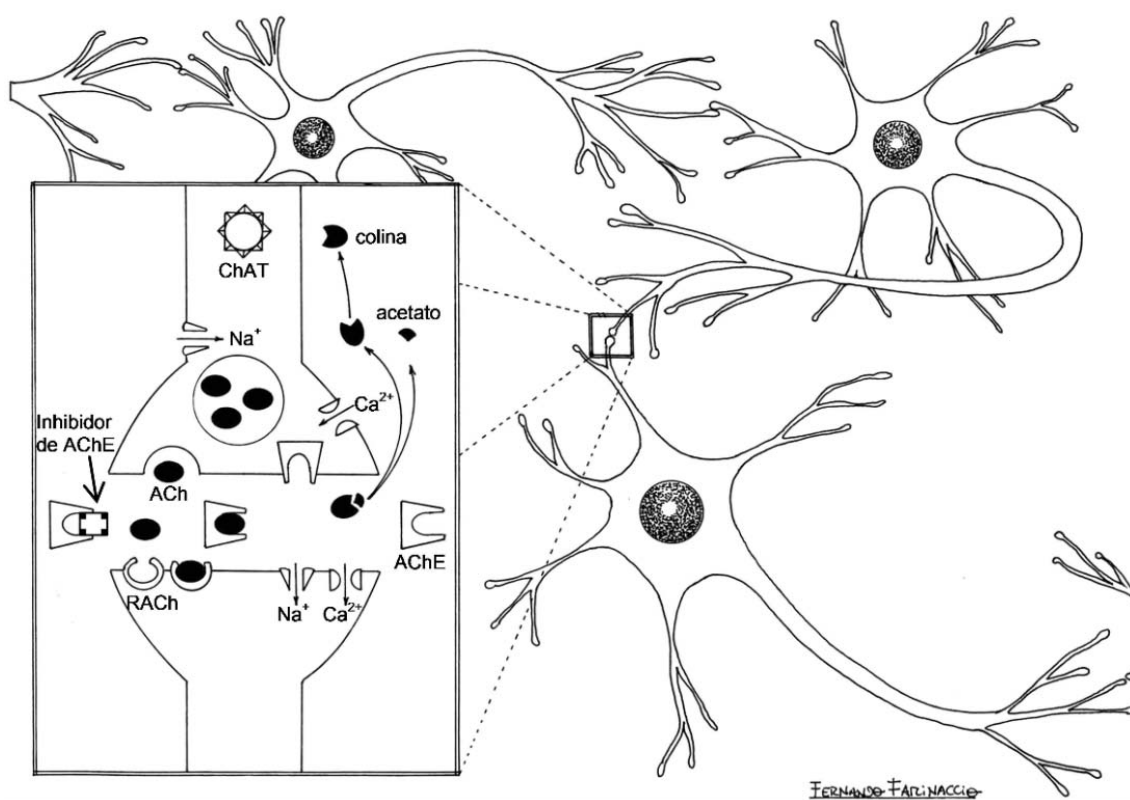


Figura 6.1: Sinapsis colinérgica: la neurona presináptica libera el neurotransmisor acetilcolina (ACh) que se une a receptores específicos (RACH) en la membrana postsináptica. La enzima acetilcolinesterasa (AChE) degrada el neurotransmisor. La colina aciltransferasa ChAT sintetiza ACh en la neurona presináptica. Tomado de Anguiano y Lascano (2011) con permiso.

La macroglia incluye a células no neuronales que pueden dividirse por mitosis con diferentes funciones en el SN como los astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann, glia radial y células endodiales. Los oligodendrocitos (en el SNC) y las células de Schwann (en el SNP) forman la vaina de mielina (membrana plasmática modificada y extendida, rica en lípidos) que rodea a algunos axones (Moser et al., 2008). Durante el desarrollo temprano, la mielina se deposita en

forma de espiral formando una vaina alrededor del axón y lo aísla permitiendo una mayor velocidad de transmisión del impulso nervioso. Los astrocitos son los más abundantes y contribuyen a formar la barrera hematoencefálica. Esta barrera presenta uniones estrechas entre las células endoteliales que rodean los capilares, así como, también interacciones entre las células endoteliales y los astrocitos; impide que diferentes productos químicos ingresen al cerebro, lo que resulta en una protección del mismo pero puede dificultar el tratamiento de enfermedades. Sin embargo, esa barrera tiene una serie de mecanismos de transporte específicos a través de los cuales llegan al cerebro los nutrientes, hormonas, aminoácidos, péptidos, etc., necesarios para el metabolismo y la función del SNC. Algunos químicos, como la cafeína, ingresan fácilmente al cerebro, al igual que muchos otros compuestos neuroactivos.

La microglia son las células semejantes a macrófagos y representan el sistema de defensa del cerebro.

Mecanismos de neurotoxicidad

A fin de comprender el mecanismo de acción de cada compuesto neurotóxico se ha avanzado en la identificación del blanco u objetivo celular. En el SN, los cuatro objetivos más frecuentes son: la neurona, el axón, la célula mielinizante o el sistema neurotransmisor. Como resultado, se pueden identificar compuestos neurotóxicos que causan neuronopatías, axonopatías, mielinopatías o toxicidad asociada a neurotransmisores (Tabla 6.1) (Moser et al., 2008). Sin embargo, se debe considerar que algunos agentes neurotóxicos son capaces de ocasionar más de un tipo de neurotoxicidad.

Tabla 6.1 Elementos y compuestos asociados con las diferentes neuropatías

Neuropatías			
Neuronopatías	Axonopatías	Mielinopatías	Efectos en la neurotransmisión
Aluminio Azida Etanol Manganeseo Mercurio (elemental, inorgánico y orgánico) Metanol Tetracloruro de carbono Trimetilestano	Acrilamida Bifenilos polibromados 2,4 D (herbicida) Disulfuro de carbono n-hexano Litio Organofosforados* Óxido de etileno Platino	Bromuro de etidio Cuprizona Hexaclorofeno Plomo Telurio Toxina diftérica Trietilestano	Ácido domoico Anfetaminas Carbamatos Cocaína LSD (dietilamida del ácido lisérgico) Muscarina Nicotina Organoclorados Organofosforados Toxina botulínica

* Compuestos organofosforados que inhiben a la enzima esterasa diana de neuropatía.

Neuronopatía

Ciertos tóxicos son específicos para las neuronas, o en ocasiones para un grupo particular de neuronas, lo cual ocasiona su lesión o, cuando la intoxicación es lo suficientemente grave, su muerte. El proceso de degeneración neuronal, una vez que ha tenido lugar, se considera irreversible y permanente e incluye la degeneración de todas sus extensiones citoplasmáticas, dendritas y axones, y de la mielina que envuelve el axón (Moser et al, 2008). Algunas de las características únicas de la neurona que incluyen: una alta tasa metabólica, la presencia de prolongaciones y una membrana excitable ocasionan que esta célula presente un mayor riesgo de ser afectada por compuestos tóxicos (Gilbert, 2012).

En general, el efecto causado por esta clase de agentes neurotóxicos se caracteriza por la aparición de encefalopatías, que producen en algunos casos una disfunción global y en otros un efecto más concreto debido a la especificidad del neurotóxico por un grupo de neuronas determinadas (lo cual ocasiona entonces una pérdida de funcionalidad particular). Un ejemplo de agente neurotóxico ampliamente estudiado es el metilmercurio (MeHg) que causa daño neuronal al afectar principalmente a las neuronas del córtex visual y del cerebelo (Costa, 2017). Por otra parte, el MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina), atraviesa la barrera hematoencefálica, es activado metabólicamente y causa daño en un área específica del cerebro donde se localizan neuronas dopaminérgicas; estas mismas neuronas son las implicadas en la enfermedad de Parkinson (Gilbert, 2012). Este compuesto surgió como un subproducto de la producción ilegal de heroína sintética (National Research Council, 1992). El MPTP se utiliza actualmente como modelo para el estudio de esta enfermedad.

Axonopatía

Los trastornos neurotóxicos denominados axonopatías son aquellos en los que el sitio primario de toxicidad es el axón. El agente neurotóxico actúa directamente sobre el axón que se degenera, y con él la mielina que lo rodea; sin embargo, el cuerpo celular de la neurona permanece intacto (Moser et al., 2008). El efecto se ha indicado como una "transección química" del axón en algún punto a lo largo de su longitud, por lo cual, el axón separado del cuerpo celular se degenera (Costa, 2017). En las axonopatías, generalmente la parte distal del axón se ve afectada primero y los axones de mayor longitud son afectados en mayor grado que los de menor longitud debido a su mayor superficie de contacto (Harris y Blain, 2004). Por otra parte, pueden verse afectadas las fibras sensitivas, motoras o ambas. La consecuencia principal de este hecho es la dificultad en la transmisión del impulso nervioso. La velocidad de conducción nerviosa a menudo se ve afectada, y los signos clínicos resultantes pueden ser pérdidas sensoriales en las extremidades y/o déficit motor. Si la acción neurotóxica tiene lugar sobre los axones del SNC el proceso es irreversible; por el contrario, el efecto tóxico sobre los axones del SNP puede ser reversible (Harris y Blain, 2004).

Una gran cantidad de medicamentos farmacéuticos y químicos industriales pueden causar axonopatías, entre ellos, la acrilamida (Moser et al., 2008). Algunos ésteres de organofosforados pueden producir axonopatías graves debido a la degeneración de los axones distales centrales y periféricos sin llegar a provocar el conocido efecto colinérgico (descripto más adelante). Los hidrocarburos alifáticos son otro claro ejemplo de sustancias que inducen neuropatías axonales, como el n-hexano (Costa, 2017).

Mielinopatía

En las mielinopatías el agente neurotóxico interacciona directamente con la vaina de mielina o con las células productoras de mielina (oligodendrocitos en el SNC y células de Schwann en el SNP). Puede ocurrir que la mielina se desnaturalice, produciéndose la separación de las láminas de mielina del axón (edema intramielínico) o que se produzca la pérdida selectiva de mielina (desmielinización) (Moser et al., 2008). La gravedad de este efecto depende directamente de la extensión de la desmielinización y de si el sistema afectado es el central o el periférico. La remielinización en el SNC ocurre solo en un grado limitado después de la desmielinización; sin embargo, las células de Schwann en el SNP son capaces de remielinizar el axón después de una lesión desmielinizante (Costa, 2017).

La mielina proporciona aislamiento eléctrico por lo cual la principal consecuencia de las mielinopatías es la alteración de la transmisión del impulso nervioso (Spencer y Lein, 2014). Más aún, cuando la desmielinización es muy extensa, puede producirse un bloqueo de la transmisión del mismo. Los síntomas asociados son debilidad, alteraciones sensoriales y parestesia (sensaciones anormales de tacto, como ardor o picadura, que se presentan sin estímulo exterior) (Costa, 2017).

Algunos elementos, como el plomo y el telurio, ejercen su acción neurotóxica sobre las células de Schwann en el SNP; mientras que, el hexaclorofeno y el trietilestaño ejercen su acción sobre la mielinización en el SNC (Spencer y Lein, 2014; Costa, 2017).

Neurotoxicidad asociada a la neurotransmisión

La neurotransmisión proporciona una variedad de blancos potenciales para agentes neurotóxicos que incluyen enzimas involucradas en la síntesis, mecanismos de almacenamiento y liberación de neurotransmisores, enzimas o sistemas de captación involucrados en la eliminación de neurotransmisores y también receptores y sus sistemas de transducción de señales acoplados (Spencer y Lein, 2014; Costa et al., 2017).

Existe un grupo importante de sustancias (insecticidas, productos farmacológicos sintéticos, etc.) que interaccionan con receptores específicos del SN y son capaces de alterar la comunicación intercelular (transináptica) (Moser et al., 2008). La principal consecuencia es la interrupción

parcial o total del impulso nervioso. El efecto agudo de estos agentes neurotóxicos depende directamente de la concentración de los mismos en el lugar donde ejercen su acción.

Existen diferentes modos de acción relacionados con la alteración de la neurotransmisión (Spencer y Lein, 2014). Los neurotóxicos pueden: 1) bloquear el receptor para que el neurotransmisor no pueda unirse al mismo y, por lo tanto, la célula receptora no pueda responder; 2) imitar la acción del neurotransmisor para que la célula receptora responda aunque no haya un neurotransmisor natural; 3) bloquear la degradación del neurotransmisor, lo cual causa una sobreestimulación de la célula receptora y 4) impedir la recaptación del neurotransmisor en la célula pre-sináptica, lo que origina un aumento del neurotransmisor y también sobreestimulación de la célula postsináptica.

Los agentes neurotóxicos que actúan sobre un neurotransmisor específico a menudo tienen efectos transitorios y la exposición debe repetirse para continuar el efecto. Sin embargo, los gases nerviosos muy potentes (por ejemplo, el gas sarín, compuesto organofosforado) bloquean permanentemente al agente responsable de la degradación de la acetilcolina y causan la muerte porque el SN no puede recuperarse (Gilbert, 2012).

Modelos de neurotóxicos y sus mecanismos de acción

Acrilamida

La acrilamida es un monómero de vinilo, altamente soluble en agua, utilizado ampliamente en la fabricación de papel, minería, tratamiento de aguas residuales e impermeabilización (LoPachin, 2004; Moreno Navarro et al., 2007). También se usa en laboratorios biotecnológicos y de investigación en biología molecular (Costa, 2017). Asimismo, este monómero se forma en diferentes alimentos cuando son sometidos a altas temperaturas (Moser et al., 2008).

La acrilamida es un agente neurotóxico cuyos efectos han sido bien documentados tanto en humanos como en animales de laboratorio. La exposición ocupacional subcrónica a bajas concentraciones de acrilamida en humanos produce neurotoxicidad caracterizada por ataxia (dificultad para coordinar los movimientos), debilidad del músculo esquelético y entumecimiento de manos y pies; esta neurotoxicidad se asoció con daño en los terminales nerviosos en el SNC y el SNP. El sello morfológico distintivo de esta neuropatía se considera que es la inflamación del terminal nervioso distal y del axón preterminal de las fibras mielinizadas más largas (LoPachin, 2004), lo cual conduce a la degeneración del axón. Por exposición a este neurotóxico se puede observar acumulación de neurofilamentos en la terminal nerviosa (Moser et al, 2008). También es característica una disminución en el número de vesículas sinápticas y de mitocondrias en el terminal nervioso, que se debe a la interferencia de la acrilamida con las proteínas involucradas en la fusión de vesículas, ya sean sinápticas o de transporte, con las membranas de destino (LoPachin, 2004).

Los estudios experimentales en animales han demostrado que la acrilamida se absorbe por todas las vías de exposición, sin embargo, la vía oral es la más rápida en todas las especies (Moreno Navarro et al., 2007). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció un valor de ingesta diaria tolerable de 12 µg/kg de peso corporal por día, basada en la neurotoxicidad observada en ratas expuestas a dosis repetidas (OMS, 1985). Por otra parte, en humanos la mayoría de los eventos tóxicos observados han sido neuropatías periféricas en trabajadores de fábricas expuestos a altas dosis, que se reflejan en debilidad muscular y déficits sensoriales (LoPachin, 2004; Moser et al., 2008). Asimismo, en trabajadores con alta exposición a la acrilamida (captación total de acrilamida 0,63 a 0,86 mg por kg por día), se ha observado una sensibilidad reducida a la vibración, el dolor y el calor, así como una disminución en la velocidad de la conducción nerviosa (Calleman, 1996).

Arsénico

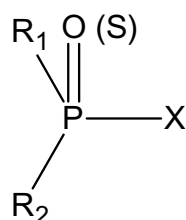
El arsénico (As) es un metaloide, muy soluble en agua, ampliamente distribuido en el mundo y, en particular, en Argentina. Proviene tanto de fuentes naturales como antropogénicas (minería, uso como plaguicida). Este elemento es altamente tóxico y su exposición crónica en humanos ha sido asociada con el Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE). Esta patología está asociada a la ingesta crónica de As presente en el agua y en los alimentos y se caracteriza por presentar lesiones de piel, alteraciones sistémicas cancerosas, afecciones cardiovasculares y neurotoxicidad (Villamil Lepori, 2015). El As se encuentra tanto en forma inorgánica como orgánica, y ambos tipos pueden existir en los estados de oxidación trivalentes o pentavalentes. En la naturaleza, el estado más común es el inorgánico pentavalente, As(V), que en el organismo se reduce a As(III), y luego puede ser metilado a ácido metil y dimetilarsténico (Mochizuki, 2019). Las formas inorgánicas son más tóxicas que las orgánicas. El mecanismo de acción del As(III) consiste en la inhibición enzimática por reacción con los grupos sulfhidrilos (-SH) de las proteínas y el As(V) puede desacoplar la fosforilación oxidativa (Nava-Ruiz y Méndez-Armenta, 2011).

La exposición al As se asocia con una amplia gama de complicaciones neurológicas en los humanos, como problemas de memoria, falta de concentración, enfermedad de Parkinson, encefalopatía y neuropatía periférica, entre otras (Mochizuki, 2019). El mecanismo postulado para la neurotoxicidad inducida por As implica, principalmente, estrés oxidativo con aumento de especies reactivas de oxígeno y de peroxidación lipídica junto con disminución de biomoléculas y actividad de enzimas antioxidantes en el SN (Singh et al., 2011; Sharma et al., 2020). Sin embargo, otros mecanismos han sido propuestos a partir de experimentos con animales: inactivación de enzimas relacionadas con la reparación de ADN y con el metabolismo energético, deficiencia de vitamina B1 (tiamina), disminución de la actividad de la enzima AChE y alteración del metabolismo de varios neurotransmisores como acetilcolina, ácido gamma aminobutírico y glutamato (Mochizuki, 2019). También, el As induce muerte celular por apoptosis en las neuronas cerebrales (Singh et al., 2011), ya que puede cruzar la barrera hematoencefálica.

Los primeros informes de daño neurológico por intoxicación con As mostraron neuropatía periférica (sensitivo-motora) con entumecimiento y parestesia de extremidades tanto por axonopatía como por desmielinización (Nava-Ruiz y Méndez-Armenta, 2011). Por otro lado, el As también puede afectar el SNC al causar encefalopatía con alteraciones en las funciones neurológicas superiores tales como aprendizaje, concentración y memoria recientes, según lo observado en humanos por exposición ocupacional aguda o crónica y en animales de laboratorio. Asimismo, se ha observado muerte neuronal por apoptosis y necrosis en ratas por exposición prenatal a As (Chattopadhyay et al., 2002). Estudios epidemiológicos realizados en México, Taiwan y Bangladesh demostraron que los niveles más altos de As urinario estaban significativamente relacionados con un peor desempeño en la memoria y comprensión verbal y en la memoria a largo plazo (revisado por Wright y Baccarelli, 2018).

Insecticidas organofosforados

Los insecticidas organofosforados, OF, se han usado extensivamente para el control de plagas en la agricultura y en hogares. Todos estos compuestos derivan del ácido fosfórico y su estructura general puede ser representada por:



donde un átomo de oxígeno o de azufre está unido mediante un doble enlace al átomo de fósforo pentavalente; X es el llamado grupo saliente que es liberado cuando el OF fosforila en su sitio activo a la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y R₁ y R₂ son, generalmente, grupos alcoxi, aunque son posibles otros sustituyentes químicos (Costa, 2008). La exposición a insecticidas OF puede causar efectos tóxicos severos tanto en hombres como en animales.

El mecanismo de acción de los insecticidas OF está asociado con la inhibición de la enzima AChE. Dado que solamente los compuestos con un enlace P=O son inhibidores efectivos de esta enzima, los insecticidas OF que contienen un enlace P=S deben ser bioactivados metabólicamente para que su actividad biológica se manifieste. Esta bioactivación que consiste en una desulfuración oxidativa es catalizada por las enzimas citocromo P450, y resulta en la formación de un “oxon” que es el análogo oxigenado del insecticida original (Costa, 2008). La enzima AChE, es una B-esterasa cuyo papel fisiológico es hidrolizar la acetilcolina, uno de los neurotransmisores más importantes en el SNC y en el SNP. La inhibición de la enzima AChE causa la acumulación de la acetilcolina en la hendidura sináptica y conduce a una sobreestimulación de los re-

ceptores colinérgicos muscarínicos y nicotínicos (Fig. 6.1). La sobreestimulación de estos receptores distribuidos ampliamente en el cuerpo causa *síndrome colinérgico* el cual incluye aumento de la sudoración y salivación, secreción bronquial profunda, miosis, aumento de la movilidad gastrointestinal, diarrea, temblores, espasmos musculares y varios efectos en el SNC. En casos de intoxicación aguda con altas concentraciones de OF puede producirse la muerte por parálisis de los músculos respiratorios (Richardson et al., 2019). La enzima fosforilada es muy estable, pero puede sufrir una hidrólisis muy lenta para regenerar la enzima original. Sin embargo, la enzima resulta inhibida irreversiblemente cuando ocurre un fenómeno conocido como “envejecimiento”, que consiste en la pérdida por hidrólisis no enzimática de uno de los dos grupos alquilo del OF (Costa, 2017).

Otra manifestación neurológica que puede desarrollarse por exposición a OF es el *síndrome intermedio* que se ha observado en el 20 a 50% de las intoxicaciones agudas con una gran variedad de insecticidas OF. Generalmente, este síndrome aparece uno a cuatro días después de la crisis colinérgica en pacientes con inhibición severa y prolongada de la enzima AChE, o en algunos casos, cuando los pacientes están completamente recuperados de la crisis colinérgica inicial. Los síntomas clásicos que definen el síndrome intermedio son una marcada debilidad de los músculos respiratorios, del cuello y de las extremidades superiores. Este síndrome no se considera un efecto directo de la inhibición de la enzima AChE y su patofisiología aún no es clara (Costa, 2008; Haliga et al., 2018).

Unos pocos OF (clorpirifos, malatión, triclofón, diclorvos, metamidofos, entre otros) pueden causar otro tipo de toxicidad conocida como *polineuropatía tardía inducida por organofosforados*, OPIDP¹. Los signos y síntomas incluyen hormigueo en las manos y pies seguido por pérdida sensorial, debilidad muscular progresiva y flacidez de los músculos esqueléticos distales de las extremidades inferiores y superiores y ataxia (Lotti y Moretto, 2005; Jokanović et al., 2011). La OPIDP puede ocurrir entre 2 y 3 semanas después de una única exposición, cuando los signos tanto de la crisis colinérgica aguda como del síndrome intermedio han disminuido y puede ser clasificada como una axonopatía sensorial-motora distal que no está relacionada con la inhibición de la AChE. El blanco molecular parece ser una esterasa presente tanto en el tejido nervioso como en otros tejidos llamada esterasa diana de neuropatía, NTE² (Richardson et al., 2019). Varios OF, dependiendo de sus estructuras químicas, pueden inhibir a la NTE así como también otros compuestos incluidos ciertos compuestos carbamatos y el fluoruro de sulfonilo. Sin embargo, sólo los OF cuyas estructuras conducen al envejecimiento de la NTE fosforilada (por un proceso análogo al descrito para la AChE) pueden causar OPIDP (Costa, 2008, Costa y Pellacani, 2014).

¹ OPIDP: organophosphate-induced delayed polyneuropathy.

² NTE: neuropathy target esterase.

Por otra parte, la exposición crónica a OF se ha asociado con desórdenes neuropsiquiátricos inducidos por exposición crónica a OF (COPIND)³, que ocurre sin síntomas colinérgicos y aparentemente no son dependientes de la inhibición de la AChE. Este desorden aparece tardíamente y persiste por un largo período, lo cual sugiere daño permanente del SNC. Los síntomas más comunes del COPIND son: déficit cognitivo, cambios en los estados de ánimo, fatiga crónica, disfunción autonómica, neuropatía periférica, distonía (trastorno en el tono y en el movimiento muscular), inestabilidad postural y rigidez de los músculos de la cara, entre otros (Jokanovič, 2018).

Estudios epidemiológicos sugieren que la exposición prenatal a insecticidas OF se asoció con un alto riesgo de trastornos del desarrollo, retrasos en el desarrollo cognitivo y déficits de atención (Bouchard et al., 2011; Muñoz-Quesada et al., 2013). Mientras que, la exposición posnatal se ha asociado con problemas de conducta, de memoria a corto plazo y de habilidades motoras en niños (London et al., 2012).

Por otro parte, cuando los investigadores analizaron específicamente plaguicidas que afectan al SNC encontraron una asociación directa y significativa entre la exposición ocupacional a OF y el desarrollo, en tiempos futuros, de las enfermedades de Parkinson (Manthripragada et al., 2010) y de Alzheimer (Hayden et al., 2010).

Mercurio

El mercurio (Hg) es el único metal líquido a temperatura ambiente, es volátil, se lo conoce desde tiempos remotos y se lo ha usado en amalgamas con otros metales desde el año 700 a. C. Es un tóxico ambiental derivado de fuentes naturales y antropogénicas. En el ambiente, el Hg elemental se origina por evaporación natural de la corteza terrestre y en las emisiones volcánicas así como de los océanos y suelos. Se lo emplea en baterías, pinturas, instrumentos de medida, minería del oro, etc. La combustión de combustibles fósiles, la incineración de basura y diversas industrias son algunas de las fuentes antropogénicas que contribuyen a la liberación de Hg a la atmósfera (Liu et al., 2008). En la actualidad, la principal fuente de contaminación con Hg es la extracción artesanal a pequeña escala de oro, principalmente en América del Sur, África y Asia (Esdaile y Chalker, 2018).

La razón por la que el Hg es dañino es que una vez liberado al ambiente no puede ser removido y es transformado por microorganismos en compuestos orgánicos, principalmente, metilmercurio (MeHg). Debido a que el MeHg es absorbido rápidamente, tiende a bioacumularse y biomagnificarse en los animales alcanzando concentraciones muy altas en lo alto de la cadena trófica (Ronchetti et al., 2006). El MeHg atraviesa las membranas biológicas, la barrera hematoencefálica e incluso la placenta. De hecho, ha habido mujeres que no presentaban síntomas

³ COPIND: chronic organophosphate induced neuropsychiatric disorders.

de envenenamiento, o eran muy leves, y dieron a luz a niños con severos déficits neurológicos y/o malformaciones físicas (Antunes dos Santos et al., 2016).

El MeHg es uno de los neurotóxicos más estudiados, debido a dos grandes episodios de envenenamiento: el de Minamata, Japón (1953-1956) y el de Irak (1971). Minamata, es un pueblo de pescadores situado en la bahía del mismo nombre donde una fábrica de acetaldehído y compuestos de vinilo vertía sus aguas residuales que contenían varios metales, entre otros, mercurio. En los sedimentos marinos, el Hg inorgánico se convirtió en MeHg. Éste se acumuló en los moluscos y peces, que fueron ingeridos por los habitantes locales (Eto, 1997). Otra tragedia aún más catastrófica, por su extensión, sucedió en Irak en 1971 donde hubo casos de intoxicación masiva por consumo reiterado de pan preparado con granos de trigo que habían sido tratados con MeHg (Bakir et al., 1973).

Los compuestos mercuriales son capaces de unirse a los grupos sulfhidrilos presentes en las proteínas, por lo cual, se afectan numerosos procesos celulares. El SNC es el principal blanco de acción del MeHg. Este agente neurotóxico causa muerte celular apoptótica o necrótica neuronal mediada por factores como la alteración de la homeostasis del calcio y del glutamato y la inducción de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (Antunes dos Santos et al., 2016). Existen diferencias significativas en el cuadro clínico que dependen de la edad del individuo y del tiempo de exposición. De hecho, el cerebro durante el desarrollo fetal resulta al menos diez veces más sensible al MeHg que el de un adulto (Ronchetti et al., 2006). En adultos, el primer síntoma luego de una exposición aguda a MeHg es la parestesia, seguido por ataxia, debilidad muscular, temblor, disartria (trastornos del habla) y discapacidad auditiva y visual. Los pacientes que presentaron estos síntomas clínicos por exposición ambiental a MeHg fueron diagnosticados con el síndrome conocido como Daño de Minamata (DM) en 1956. Estos signos neurológicos se correlacionan con daños en las neuronas de la corteza visual en el cerebro y de las células granulosas cerebelares (Eto, 2010). En los pacientes con DM también se afecta el SNP y los nervios sensoriales resultan más dañados que los nervios motores (Costa et al., 2004). En niños, los síntomas por envenenamiento con MeHg son: retraso mental, trastornos del movimiento, convulsiones, reflejos primitivos y dificultad para hablar. Las diferencias relacionadas con la edad también se han observado en otros mamíferos, aunque las áreas específicas dañadas pueden ser diferentes (Moser et al., 2008).

Si bien todas las formas del Hg son potencialmente neurotóxicas, entre los compuestos inorgánicos el vapor de Hg es la más peligrosa, dado que puede difundir a través de los pulmones hasta la sangre y luego alcanzar el cerebro, donde puede causar daños severos y dejar secuelas algunas similares a las de las enfermedades psiquiátricas. Desde hace más de 400 años se conoce que la exposición a vapores de Hg causó trastornos neuropsiquiátricos entre los obreros involucrados en la fabricación de sombreros de fieltro. El síntoma psiquiátrico por exposición crónica a vapores de Hg es el *eretismo*, estado de excitación del SN sensitivo. Dicha exposición ocupacional produjo los cambios neurológicos y de conducta descriptos por el Sombrero Loco,

personaje de *Alicia en el país de las maravillas*, de Lewis Carroll. El eretismo mercurial se caracteriza por cambios severos en la conducta y la personalidad, excitabilidad aumentada, pérdida de memoria e insomnio y en los casos más severos, delirio y alucinaciones (Candura et al., 1998).

Plomo

El plomo (Pb) es un metal cuya toxicidad se conoce desde tiempos remotos. Está presente naturalmente en el suelo y el agua a muy bajos niveles y la actividad antropogénica favoreció su distribución en el medio ambiente. La producción significativa de Pb comenzó alrededor del año 3000 a. C. El imperio Romano fue la primera sociedad que usó ampliamente este metal para recubrir techos y cascos de navíos y para fabricar tuberías, utensilios de cocina y otros objetos. También lo utilizó como aditivo para el vino romano, debido a su sabor ligeramente dulce. Ya en aquellos tiempos hubo informes que afirmaban que el Pb causaba cólicos severos, anemia y gota (Gilbert, 2012).

El Pb se ha usado en los últimos dos siglos, principalmente en pinturas y en naftas (como tetraetilo de plomo, un antidetonante). La prohibición de las pinturas de Pb en la década de 1970 y la eliminación gradual de la nafta con plomo en la década de 1980 contribuyeron significativamente a la disminución de la exposición a este metal, no obstante, continua siendo un importante y ubicuo contaminante ambiental (Costa, 2017). También, fue un material muy utilizado en plomería, pero debido a los problemas de envenenamiento se prohibió su uso. El Pb es empleado en la fabricación de municiones, soldaduras, electrodos de baterías de almacenamiento recargables, en compuestos que se utilizan como plaguicidas, etc.

El Pb forma enlaces covalentes con los grupos sulfhidrilos. Muchas enzimas contienen el aminoácido cisteína, que tiene un grupo sulfhidrilo, y la unión al metal desorganiza su estructura terciaria y las inactiva, produciendo los síntomas que se asocian con el envenenamiento por Pb. Puede causar estrés oxidativo al unirse a enzimas antioxidantes. Además, interfiere en diferentes etapas de la síntesis de las ferroporfirinas (por ejemplo, grupo hemo de la hemoglobina). El Pb penetra casi todos los órganos y sistemas del cuerpo humano, pero el blanco principal de su toxicidad es el SNC. En el SN bloquea el receptor conocido como N-metil-D-aspartato, un receptor de glutamato involucrado en la maduración de la plasticidad cerebral (Shukla et al., 2018). A nivel molecular, el Pb interfiere con la acción reguladora del calcio en la función celular y puede interrumpir muchas actividades biológicas intracelulares (Liu et al., 2008).

En adultos, el efecto neurotóxico por exposición a niveles intermedios de Pb es una mielopatía y a niveles más altos de Pb es una severa encefalopatía. La sintomatología clásica de la neuropatía por Pb consiste en debilidad muscular que involucra, principalmente, a extensores de muñecas y dedos para luego extenderse a otros músculos. Además, la exposición a Pb aumenta el riesgo de numerosas condiciones que pueden tener efectos adversos sobre las funciones del SN, incluidas hipertensión, insuficiencia renal, función tiroidea deteriorada, deficiencia en vitamina D y partos prematuros. El pronóstico para su recuperación es bueno siempre que finalice

la exposición prontamente. Mientras que, la encefalopatía por Pb resulta en desarrollo de irritabilidad, dolor de cabeza, embotamiento mental y dificultad de atención, pérdida de memoria, temblor y alucinaciones pocas semanas después de la exposición. Los síntomas pueden empeorar abruptamente hacia parálisis, convulsiones, delirio, coma o muerte (Mason et al., 2014). En niños la exposición a Pb, incluida la exposición prenatal a muy bajos niveles, se asocia con una variedad de desórdenes neuroconductuales tales como bajo rendimiento académico, disminución del coeficiente intelectual, problemas de conducta y retraso en el desarrollo psicomotor (Aguilar Valdéz et al., 2003; Goodlad et al., 2013; Goel y Aschner, 2021). Los niños también pueden desarrollar encefalopatía por Pb a una dosis más baja que los adultos. Además, se ha demostrado una muy fuerte asociación entre niveles de Pb en sangre de niños preescolares con conductas criminales desarrolladas años más tarde en esos jóvenes (Nevin, 2007). De hecho, estudios realizados en Estados Unidos indicaron que la reducción de la exposición al Pb de niños en la década de 1990 contribuyó a una subsecuente reducción, aproximadamente del 56%, de crímenes violentos (Reyes, 2007).

Ensayos y biomarcadores de neurotoxicidad

Los ensayos de toxicidad aguda y crónica tradicionales pueden en ocasiones detectar efectos neurotóxicos. Sin embargo, para probar efectos más sutiles o específicos de neurotoxicidad existen protocolos de ensayos en roedores establecidos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 1998) y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE, 1997). Luego de la identificación de efectos neurotóxicos, se requieren ensayos posteriores que pueden incluir diferentes puntos finales de ensayo como: evaluación de comportamiento, determinaciones electrofisiológicas y neuroquímicas (Costa, 2017).

En este sentido, los *biomarcadores* se definen como cambios moleculares, bioquímicos, celulares y fisiológicos, en humanos y otros organismos, asociados con una determinada exposición a agentes tóxicos. En el SN los indicadores de toxicidad pueden ser cambios de comportamiento que pueden evaluarse en animales o en humanos (por ejemplo, déficit de memoria), cambios electrofisiológicos (por ejemplo, cambios en el electroencefalograma), cambios morfológicos (por ejemplo, muerte neuronal en regiones celulares específicas) y cambios bioquímicos/moleculares (por ejemplo, disminución de la actividad de una enzima) (Costa y Pellacani, 2004). El biomonitoreo tradicional de contaminantes químicos como metales, plaguicidas, solventes (y/o sus metabolitos) en fluidos biológicos (orina, sangre) y en tejidos (cabello) ha sido ampliamente utilizado en neurotoxicología como *biomarcador de exposición*. Por ejemplo, la determinación de elementos que tienen efectos neurotóxicos como plomo en sangre o arsénico y mercurio en cabello. La limitante de estas determinaciones es que reflejan en general exposiciones recientes. Con respecto a los *biomarcadores de susceptibilidad* en neurotoxicología, se debe considerar que existen factores genéticos que pueden modular la respuesta a los agentes neurotóxicos. En

este sentido, los compuestos orgánicos pueden ser bioactivados o detoxificados por enzimas como las citocromo P450 o las glutatión S-transferasas entre otras y, por tanto, los polimorfismos de éstas pueden tener incidencia en la diferente susceptibilidad del SNC (Wallace, 2005). Los *biomarcadores de efecto* permiten identificar efectos adversos y modificaciones del estado de salud de los organismos expuestos. Debido a la complejidad del SN es difícil hallar biomarcadores de efecto neurotóxico que resulten genéricos. Se han encontrado marcadores neurotóxicos de efecto en el área de la neurotransmisión que incluyen el metabolismo de los neurotransmisores, la interacción con los receptores o la actividad de enzimas relevantes. En humanos se busca medir estos marcadores en células periféricas que reflejen lo que ocurre en el SNC; por ejemplo, la determinación de la actividad de AChE en eritrocitos, de la enzima monoamina oxidasa (metabolismo de serotonina y noradrenalina) en plaquetas o de receptores muscarínicos de acetilcolina en linfocitos (Costa y Pellacani, 2014; Basu, 2015). Es importante considerar que una cuestión relevante en neurotoxicología es conocer cómo se traducen los cambios observados de estos biomarcadores en daño estructural o funcional en el SN y, en última instancia en resultados adversos (Basu, 2015).

Por otra parte, algunos autores definen *econeurotoxicidad* como la neurotoxicidad resultante de la exposición a químicos ambientales en especies diferentes a la humana (Legradi et al., 2018). Algunos de los biomarcadores relacionados con la neurotransmisión se estudian también en diversas especies de invertebrados y vertebrados, como lombrices, bivalvos, peces, mamíferos y aves silvestres. Estos incluyen entre otros, la determinación de la actividad de enzimas como AChE, monoamino oxidasa y descarboxilasa del ácido glutámico, la cuantificación de niveles de neurotransmisores como serotonina y dopamina o el estudio de receptores de neurotransmisores (Basu, 2015). A fin de analizar alteraciones neurotóxicas se realizan también estudios de comportamiento en peces e invertebrados acuáticos (bivalvos y crustáceos) que evalúan la velocidad de natación, capacidad de huir de predadores, cambios en la alimentación, en la búsqueda de pareja o refugio causados por diferentes agentes neurotóxicos entre ellos insecticidas OF, carbamatos (CB) y neonicotinoides (revisado por Legradi et al., 2018). Es importante señalar que estos cambios pueden tener consecuencias en la supervivencia a campo de los organismos expuestos y, por tanto, en las poblaciones naturales.

La actividad de acetilcolinesterasa como biomarcador de neurotoxicidad

El biomarcador de efecto más conocido para la neurotoxicidad es la medición de la inhibición de AChE (Legradi et al., 2018). Esta enzima es el blanco primario de acción de los insecticidas OF y CB, que fosforilan o carbamilan el sitio activo de la misma y causan su inactivación (Costa, 2008). Como se ha mencionado previamente, esta enzima presente en el SN de humanos y animales degrada al neurotransmisor acetilcolina, y su inhibición lleva a una crisis colinérgica. Además de los insecticidas anticolinesterásicos, otros tóxicos son capaces de inhibir la actividad de esta enzima, pero generalmente en menor proporción,

como por ejemplo metales y metaloides e insecticidas neonicotinoides (Guilhermino et al., 1998; Győri et al., 2017).

La técnica utilizada para determinar la actividad de AChE es un ensayo colorimétrico descrito por Ellman et al. (1961). Se utiliza como sustrato la acetiltiocolina, de estructura análoga al sustrato natural. La enzima AChE hidroliza al sustrato y se produce ácido acético y tiocolina. Subsecuentemente, el grupo tiol de la tiocolina reacciona con el reactivo de color, ácido 5,5'-ditiobisnitrobenzoico, dando un producto coloreado. La aparición de color (amarillo) se mide en el espectrofotómetro en función del tiempo de reacción.

En animales, la actividad de esta enzima se cuantifica usualmente en homogenados de cerebro o de todo el cuerpo de organismos expuestos (Ferrari et al., 2007; Anguiano et al., 2017). En humanos se cuantifica la actividad de AChE de eritrocitos, y se ha establecido que su actividad correlaciona bien con la actividad enzimática en el SN (Costa y Pellacani, 2014). Otra alternativa de biomarcador no invasivo es determinar la actividad de la enzima butirilcolinesterasa en plasma de humanos (Costa y Pellacani, 2014) y de animales (Troiano y Grue, 2016); se cuantifica utilizando como sustrato butiriltiocolina. La función fisiológica de esta enzima es poco clara, por lo cual algunos autores consideran su inhibición como un biomarcador de exposición más que de efecto. Otra alternativa para evaluar la neurotoxicidad de compuestos tóxicos o también la calidad de muestras de agua es utilizar AChE purificada comercial; sin embargo, este ensayo puede tener interferencias que modifiquen los resultados (Legradi et al., 2018).

La utilidad de la enzima AChE como biomarcador de exposición/efecto en estudios de laboratorio y de monitoreo ambiental está ampliamente documentada (Fulton y Key, 2001; Nunes, 2011; Fulton et al., 2013). Se ha evaluado en peces, aves, mamíferos y en diferentes especies de invertebrados (Ferrari et al., 2009; Nunes, 2011). En general una inhibición del 20% se considera indicativa de exposición a algún agente neurotóxico, fundamentalmente OF y CB, y con inactivaciones superiores al 30% se considera que existe un efecto perjudicial (National Research Council, 1992). Al utilizarla como biomarcador, tanto en humanos como en otros organismos, se debe tener en cuenta la necesidad de conocer la actividad basal de esta enzima así como su variación estacional y la influencia de factores como edad, sexo, etc. (Nunes, 2011; Costa y Pellacani, 2014). Por otra parte, se ha establecido una correlación entre inhibición de la enzima y efectos en el comportamiento (Beauvais et al., 2001; Fulton et al., 2013); por lo cual, se considera un marcador bioquímico que tiene relevancia en niveles de organización superiores ya que indica efectos fisiológicos que afectan no sólo la supervivencia individual sino la poblacional (Duquesne, 2006). El uso de la enzima AChE como biomarcador se ve favorecido debido a varios aspectos como: sensibilidad a una gran cantidad de contaminantes ambientales, facilidad de cuantificación de bajo costo y buena reproducibilidad, adaptabilidad a una gran cantidad de especies de distintos ecosistemas y relevancia tanto biológica como ecológica (Nunes, 2011).

Evaluación del efecto de insecticidas utilizados en la Patagonia Norte sobre la actividad de acetilcolinesterasa

En la zona frutihortícola situada en la Patagonia Norte Argentina se han aplicado intensivamente insecticidas OF y CB para el control de la carpocapsa, plaga de manzanos y perales, en las últimas décadas. A fin de evaluar el efecto de la exposición a OF y CB en diferentes especies “no blanco” se ha evaluado la actividad de AChE mediante ensayos de laboratorio. Algunos de los resultados más relevantes obtenidos se mencionan a continuación.

La exposición aguda (96 h) a los insecticidas metilazinfos, OF, y carbaril, CB, causa inhibición de la actividad de AChE a concentraciones subletales en juveniles del pez aclimatado *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris). Los juveniles son capaces de sobrevivir con una inhibición del 70-80% de la actividad de AChE. Existe una diferencia de dos órdenes de magnitud entre la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) para AChE y la concentración que produce la mortalidad del 50% de los individuos expuestos (CL₅₀) (Ferrari et al., 2004). La susceptibilidad de los peces así como la sensibilidad de AChE es mayor para el OF que para el CB. La enzima AChE de cerebro y músculo resulta significativamente inhibida por exposición aguda a una concentración subletal de metilazinfos (1 µg/L) y la recuperación de la actividad enzimática cerebral se alcanza luego de 21 días en agua libre de insecticida; no obstante, no se observa en ese tiempo la recuperación de la AChE muscular. Esto remarca su utilidad como biomarcador, ya que puede manifestar efectos de exposición al OF aun cuando el insecticida no pueda ser detectado en el agua. La recuperación luego de la exposición al CB es más rápida, en concordancia con la inhibición menos persistente de estos compuestos. En ambos casos, se debe considerar que la inhibición de la actividad AChE de estos peces puede resultar letal a campo por los efectos sobre comportamientos claves para la supervivencia (Ferrari et al., 2004, 2007).

Por otra parte, las larvas del sapo común argentino *Rhinella arenarum* resultan menos susceptibles a ambos insecticidas que los juveniles de *O. mykiss* y la sensibilidad de la enzima AChE también es menor. La actividad enzimática se recupera prácticamente a valores controles rápidamente (48-96 h) tanto en los expuestos a carbaril como a metilazinfos (Ferrari et al., 2004).

La actividad de AChE resulta un buen biomarcador de exposición/efecto para los crustáceos anfípodos autóctonos *H. curvispina* expuestos a metilazinfos y carbaril. La enzima se inhibe significativamente luego de una exposición aguda (48-96 h) a concentraciones ambientales de estos insecticidas. El análisis de riesgo realizado indica que las concentraciones encontradas de ambos insecticidas en aguas superficiales de la zona frutihortícola implican un riesgo para los anfípodos *H. curvispina*. Existen diferencias en la susceptibilidad y en la sensibilidad de la enzima AChE entre poblaciones naturales de *H. curvispina* provenientes de una zona prístina y de una zona de aplicación de plaguicidas, lo cual indica una tolerancia de la población preexpuesta y un impacto real de la aplicación de plaguicidas en esta región (Anguiano et al., 2008; 2014; 2017).

Bibliografía

- Anguiano, O. L., Ferrari, A., Soleño, I. J., Martínez, M. C., Venturino, A., Pechen de D'Angelo, A. M., Montagna, C. M. (2008). Enhanced esterase activity and resistance to azinphosmethyl in target and nontarget organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(10), 2117–2123.
- Anguiano O. L., Lascano C. I. (2011). Capítulo 3: Modo de acción de los plaguicidas. En O. L. Anguiano y M. C. Montagna (Eds.). *Clasificación y Toxicología de Plaguicidas* (187–233). Neuquén: Educo.
- Anguiano, O. L., Castro, C., Venturino, A., Ferrari, A. (2014). Acute toxicity and biochemical effects of azinphos methyl in the amphipod *Hyaella curvispina*. *Environmental Toxicology*, 29(9), 1043–1053.
- Anguiano, O. L., Vacca, M., Rodriguez Araujo, M. E., Montagna, M., Venturino, A., Ferrari, A. (2017). Acute toxicity and esterase response to carbaryl exposure in two different populations of amphipods *Hyaella curvispina*. *Aquatic Toxicology*, 188, 72–79.
- Antunes dos Santos, A., Appel Hort, M., Culbreth, M., López-Granero, C., Farina, M., Rocha, J. B. T., Aschner, M. (2016). Methylmercury and brain development: A review of recent literature. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 38, 99–107.
- Bakir, F., Damluji, S. F., Amin-Zaki, L., Murtadha, M., Khalidi, A., al-Rawi, N. Y., Tikriti, S., Dahir, H. I., Clarkson, T. W., Smith, J. C., Doherty, R. A. (1973). Methylmercury poisoning in Iraq. *Science*, 181, 230–241.
- Basu, N. (2015). Applications and implications of neurochemical biomarkers in environmental toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(1), 22–29.
- Beauvais, S. L., Jones, S. B., Parris, J. T., Brewer, S. K., Little, E. E. (2001). Cholinergic and Behavioral Neurotoxicity of Carbaryl and Cadmium to Larval Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 90, 84–90.
- Bouchard, M. F., Chevrier, J., Harley, K. G., Kogut, K., Vedar, M., Calderon, N., Trujillo, C., Johnson, C., Bradman, A., Barr, D. B., Eskenazi, B. (2011). Prenatal exposure to organophosphate pesticides and IQ in 7-year-old children. *Environmental Health Perspectives*, 119, 1189–1195.
- Calleman, C. J. (1996). The Metabolism and Pharmacokinetics of Acrylamide: Implications for Mechanisms of Toxicity and Human Risk Estimation. *Drug Metabolism Reviews*, 28(4), 527–590.
- Candura, S. M., Manzo, L., Costa, L. G. (1998). Role of occupational neurotoxicants in psychiatric and neurodegenerative disorders. En L. G. Costa y L. Manzo (Eds.), *Occupational Neurotoxicology* (131167). Boca Raton: CRC Press.
- Chattopadhyay S, Bhaumik S, Nag Chaudhury A, Das Gupta S. (2002). Arsenic induced changes in growth development and apoptosis in neonatal and adult brain cells in vivo and in tissue culture. *Toxicology Letters*, 128, 73–84.
- Costa, L. G., Aschner, M., Vitalone, A., Syversen, T., Soldin, O. P. (2004). Developmental neuropathology of environmental agents. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 87–110.

- Costa, L. G. (2008). Toxic effects of pesticides. En C. D. Klaassen (Ed.), *Casarett and Doull's toxicology the basic science of poisons* (883-930). San Diego: McGraw-Hill Companies.
- Costa, L. G., Pellacani, C. (2014). Central nervous system toxicity biomarkers. En R. Gupta (Ed.) *Biomarkers in Toxicology* (157-168). San Diego: Academic Press.
- Costa, L. G. (2017). Overview of Neurotoxicology. *Current Protocols in Toxicology*, 74, 11.1.1-11.1.11.
- Duquesne, S. (2006). Effects of an organophosphate on *Daphnia magna* at suborganismal and organismal levels: implications for population dynamics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(2), 145–150.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95.
- Esdaile, L. J., Chalker, J. M. (2018). The mercury problem in artisanal and small-scale gold mining. *Chemistry – A European Journal*, 24(27), 6905–6916.
- Eto, K. (1997). Pathology of Minamata disease. *Toxicology Pathology*, 2(6), 614–623.
- Eto, K., Marumoto, M., Takeya M. (2010). The pathology of methylmercury poisoning (Minamata disease). *Neuropathology*, 30, 471–479.
- Ferrari, A., Anguiano, O. L., Soleño, J., Venturino, A., Pechen de D'Angelo, A. M. (2004). Different susceptibility of two aquatic vertebrates (*Oncorhynchus mykiss* and *Bufo arenarum*) to azinphos methyl and carbaryl. *Comparative Biochemistry and Physiology, Toxicology & Pharmacology*, 139(4), 239–243.
- Ferrari, A., Venturino, A., Pechén de D'Angelo, A. M. (2007). Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Toxicology & Pharmacology*, 146(3), 308–313.
- Ferrari, Ana; Pechen de D'Angelo, A. M; Venturino, A. (2009). Primary and secondary targets of action - response to anticholinesterase pesticide exposure in fish: Trends in underlying molecular mechanisms. En C. M. Kanzantzakis (Ed.). *Progress in Pesticides Research* (219–253). New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Fulton, M. H., Key, P. B., DeLorenzo, M. E. (2013). Insecticide Toxicity in Fish. *Fish Physiology* 33, 309-368.
- Fulton, M. H., Key, P. B. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1), 37–45.
- Gilbert, S. G. (2012). *A Small Dose of Toxicology*. Seattle: Healthy World Press.
- Goel, A., Aschner, M. (2021) The Effect of Lead Exposure on Autism Development. *International Journal of Molecular Sciences* 22(4), 1637.
- Goodlad, J. K., Marcus, D. K., Fulton J. J. (2013). Lead and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) symptoms: A meta-analysis. *Clinical Psychology Review*, 33, 417–425.
- Guilhermino, L., Barros, P., Silva, M. C., Soares, A. M. V. M. (1998). Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphates and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers*, 3, 157–163.

- Győri, J., Farkas, A., Stolyar, O., Székács, A., Mörtl, M., Vehovszky, Á. (2017). Inhibitory effects of four neonicotinoid active ingredients on acetylcholine esterase activity. *Acta Biologica Hungarica*, 68(4), 345–357.
- Haliga, R. E., Morarasu, B. C., Ursaru, M., Irimioaia, V., Sorodoc, L. (2018). New insights into the organophosphate-induced intermediate syndrome. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 69, 191–195.
- Harris, J. B., Blain, P. G. (2004). Neurotoxicology: What the neurologist needs to know. *Neurology in Practice*, 75, 29–34.
- Hayden, K. M., Norton, M. C., Darcey, D., Ostbye, T., Zandi, P. P., Breitner, J. C., Welsh-Bohmer, K. A. (2010). Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: the Cache County study. *Neurology*, 74(19), 1524–1530.
- Jokanovič, M., Kosanovič, M., Brkič, D., Vukomanovič, P. (2011). Organophosphate induced delayed polyneuropathy in man: An overview. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 113, 7–10.
- Jokanovič, M. (2018). Neurotoxic effects of organophosphorus pesticides and possible association with neurodegenerative diseases in man: A review. *Toxicology*, 410, 125–131.
- Ladefoged, O., Lam, H. R., Ostergaard, G., Nielsen, E., Arlien Soborg, P. (1995). Neurotoxicology: Review of definitions, methodology and criteria. Copenhagen: Danish Environmental Protection Agency.
- Legradi, J. B., Di Paolo, C., Kraak, M. H. S., van der Geest, H. G., Schymanski, E. L., Williams, A. J., Hollert, H. (2018). An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment. *Environmental Sciences Europe*, 30(1), 1–34.
- Liu, J., Goyer, R. A., Waalke, M. P. (2008). Toxic effects of metals. En C. D. Klaassen (Ed.), *Casarett and Doull's toxicology the basic science of poisons* (931–979). San Diego: McGraw-Hill Companies.
- London, L., Beseler, C., Bouchard, M.F., Bellinger, D. C., Colosio, C., Grandjean, P., Harari, R., Kootbodien, T., Kromhout, H., Little, F., Meijster, T., Moretto, A., Rohlman, D. S., Stallones, L. (2012). Neurobehavioral and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. *Neurotoxicology*, 33(4), 887–896.
- LoPachin, R. M. (2004). The changing view of acrylamide neurotoxicity. *NeuroToxicology*, 25(4), 617–630.
- Lotti, M., Moretto, A. (2005). Organophosphate-induced delayed polyneuropathy. *Toxicological Reviews*, 2005, 24(1), 37–49.
- Manthripragada, A. D., Costello, S., Cockburn, M. G., Bronstein, J. M., Ritz, B. (2010). Paraoxonase 1, agricultural organophosphate exposure, and Parkinson disease. *Epidemiology*, 21, 87–94.
- Mason, L. H., Harp, J. P., Han, D. Y. (2014). Pb Neurotoxicity: Neuropsychological Effects of Lead Toxicity. *BioMed Research International*, 2014, 1–8.
- Mochizuki, H. (2019). Arsenic Neurotoxicity in Humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 3418.

- Moreno Navarro, I. M., Rubio Armendáriz, I. M., Gutiérrez Fernández, A. J., Cameán Fenández, A. M., Hardisson De La Torre, A. (2007). La acrilamida, contaminante químico de procesado: Revisión. *Revista de Toxicología*, 24(1), 1–9.
- Moser, V. C., Aschner, M., Richardson R. J., Philbert, M. A. (2008) Toxic responses of the nervous system. En C. D. Klaassen (Edit.). *Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons* (631–664). New York: McGraw-Hill.
- Muñoz-Quezada, M. T., Lucero, B. A., Barr, D. B., Kyle Steenland, K., Levy, K., Barry Ryan, P., Iglesias, V., Alvarado, S., Concha, C., Rojas, E., Vega, C. (2013). Neurodevelopmental effects in children associated with exposure to organophosphate pesticides: A systematic review. *NeuroToxicology*, 39, 158–168.
- National Research Council. (1992). *Environmental Neurotoxicology*. Washington, DC: The National Academies Press.
- Nava-Ruiz, C., Méndez-Armenta, M. (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Archivos de Neurociencias*, 16(3), 140–147.
- Nevin, R. (2007). Understanding international crime trends: The legacy of preschool lead exposure. *Environmental Research*, 104, 315–336.
- Nunes, B. (2011). The Use of Cholinesterases in Ecotoxicology. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 212, 29–59.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) (1997). *Test guideline 424. OECD guideline for testing of chemicals*. Neurotoxicity study in rodents. Paris: OECD.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (1985). *Acrylamide. Environmental Health Criteria 49*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. Recuperado de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc49.htm>.
- Reyes, J. W. (2007). Environmental policy as social policy? The impact of childhood lead exposure on crime. *The B.E. Journal of Economic Analysis & Policy* 7(1), 1–43.
- Richardson, J. R., Fitsanakis, V., Westerink, R. H. S., Kanthasamy, A. G. (2019). Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathologica*, 138(3), 343–362.
- Ronchetti, R., Zuurbier M., Jesenak, M., Koppe, J. G., Ahmed, U. F., Ceccatelli, S., Villa M. P. (2006). Children's health and mercury exposure. *Acta Pædiatrica*, 95(453), 36–44.
- Singh, A. P., Goel, R. K. & Kaur, T. (2011). Mechanisms pertaining to arsenic toxicity. *Toxicology International*, 18(2), 87–93.
- Sharma, S., Wakode, S., Sharma, A., Nair, N., Dhobi, M., Wani. M. A., Pottoo, F. H. (2020) Effect of environmental toxicants on neuronal functions. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(36), 44906–44921.
- Shukla, V., Shukla, P., Tiwari, A. (2018). Lead poisoning. *Indian Journal of Medical Specialties*, 9(3), 146–149.
- Spencer, P. S., Lein, P. J. (2014). Neurotoxicity. En: P. Wexler, (Ed.) *Encyclopedia of Toxicology* (489–500). San Diego: Academic Press.

- Troiano, A. T., Grue, C. E. (2016). Plasma cholinesterase activity as a biomarker for quantifying exposure of green sturgeon to carbaryl following applications to control burrowing shrimp in Washington State. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35, 2003–2015.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1998). *Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6200. Neurotoxicity screening battery*. Washington DC: USEPA.
- Villamil Lepori, E. C. (2015). Hidroarsenicismo crónico regional endémico en Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 49(1), 83–104.
- Wallace, D. R. (2005). Overview of molecular, cellular, and genetic neurotoxicology. *Neurologic Clinics*, 23, 307–320.
- Wright, R. O., Baccarelli, A. (2018). Metals and Neurotoxicology. *The Journal of Nutrition*, 137(12), 2809–2813.

CAPÍTULO 7

Genotoxicidad y carcinogénesis

Celeste Ruiz de Arcaute, Milagros Laborde,

Sonia Soloneski y Marcelo L. Larramendy

La Genética Toxicológica –también conocida como Genotoxicología- es una disciplina que surge como resultado de la integración de la Genética y la Toxicología, siendo, por consiguiente, la rama de la Ciencias Naturales que estudia cómo diferentes tipos de agentes xenobióticos – físicos, químicos o biológicos– pueden dañar al material genético tanto en la interfase como durante la división celular de células somáticas y/o germinales. El término xenobiótico deriva del griego (xeno ξένος (gr. 'extraño, forastero') + bio βίος (gr. 'vida') + tik os/ ē (gr.) y etimológicamente significa ajeno a la vida. Este término es de carácter general y es utilizado para designar a todas las sustancias extrañas que ingresan a los seres vivos (Mudry y Carballo, 2006). Los primeros estudios relacionados con la Genética Toxicológica fueron realizados en la década de 1920 evaluando los efectos inducidos por rayos X y luz UV en organismos modelo como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Insecta: Diptera: Drosophilidae) (Mudry y Carballo, 2006). Sin embargo, no fue hasta las décadas de 1950 y 1960, tanto con el descubrimiento de la estructura del ADN en 1953 por Watson y Crick (Watson y Crick, 1953) así como el reconocimiento de la Genética Toxicológica como disciplina en el año 1969, que el estudio del impacto negativo producido por agentes ambientales en la salud humana adquirió verdadero protagonismo.

En las últimas décadas ha habido un notable incremento en el interés público sobre los efectos perjudiciales primarios y/o secundarios que diversos agentes, producto de procesos tecnológicos e industriales, pueden producir tanto en la salud humana como en la ambiental. Por otra parte, se conoce que la probabilidad de que un xenobiótico induzca daño sobre el material genético depende de diferentes tipos de variables tales como su concentración en el ambiente, la vía de ingreso y metabolización en un organismo así como la capacidad de las distintas células y tejidos para contrarrestar el daño inducido, entre otros factores (Mudry y Carballo, 2006).

La Genotoxicología comprende, por consiguiente, el estudio de la acción nociva de xenobióticos sobre los componentes hereditarios de los seres vivos y las consecuencias que su exposición genera sobre los ecosistemas y la biota. Por lo tanto, los xenobióticos pueden ser agentes físicos tales como la temperatura, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, radiaciones electromagnéticas; agentes químicos, tales como metales, halógenos, ácidos orgánicos e inorgánicos, entre otros y agentes biológicos tales como algunos parásitos, bacterias, hongos y virus (Repetto

Jiménez y Reppeto Kuhn, 2009). Esta disciplina estudia las modificaciones de la estructura genética y sus manifestaciones en la reproducción de la célula, tejido o del individuo, en procesos conocidos como mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis. Todo agente xenobiótico capaz de interactuar de manera negativa, tanto física como químicamente, con las bases del ADN y alterar su estructura es considerado un mutágeno. Por otro lado, el término “genotóxico” es más amplio, ya que incluye los agentes que inducen no sólo mutaciones sino cualquier otro tipo de daño acontecido en el ADN celular (Mudry y Carballo, 2006).

Según una revisión reciente (Mohamed et al., 2017), los agentes genotóxicos de acuerdo al efecto que producen pueden clasificarse en:

Carcinogénicos o agentes que causan o promueven cáncer. Los cambios inducidos son irreversibles. Entre los ejemplos de agentes carcinogénicos se encuentra la radiación UV solar, compuestos químicos como hidrocarburos aromáticos policíclicos, benceno, cromo VI, plaguicidas, entre otros.

Mutagénicos o agentes causantes de mutaciones sobre el material hereditario. Ejercen distintos tipos de daño en el material genético, los cuales pueden ser heredables. Entre los ejemplos de mutágenos se encuentran las sustancias radiactivas, los rayos X, la radiación UV y ciertas sustancias químicas. Pueden dañar a las células y provocar enfermedades, entre ellas provocar un desarrollo neoplásico.

Teratogénicos o agentes causantes de anomalías de carácter anatómico o funcional durante el desarrollo embrionario de un organismo. Provocan el desarrollo de diferentes tipos y/o niveles de defectos congénitos. Entre los ejemplos de agentes teratogénicos se encuentran compuestos como la talidomida, cocaína, retinoides, estreptomina, carbamazepina, entre otros.

Se conoce que durante la exposición a xenobióticos, gran parte de ellos derivados de la actividad antropogénica, se generan diferentes tipos de alteraciones nocivas sobre el material genético. El daño en el ADN surge como consecuencia de la modificación permanente de la estructura primaria de ésta molécula, que podría conducir, en última instancia, a una modificación en la función proteica, en la inactivación/activación génica y en la generación de mutaciones en el ADN (Gagné et al., 2014). Si la mutación del/de los gen(es) se produce en un gen con un rol importante en la diferenciación, comunicación o crecimiento celular, pueden producirse diversas alteraciones negativas en el funcionamiento celular y en última instancia, la generación de un proceso neoplásico o la muerte celular. El daño en el material genético es causado por la interacción de una sustancia genotóxica con la estructura primaria y/o con la secuencia de bases púricas y pirimidínicas de la molécula del ADN. Estas sustancias interaccionan con la secuencia de bases específicas del ADN causando diferentes tipos de lesiones en el material genético como la formación de rupturas, fusiones, deleciones, amplificaciones, aductos, uniones cruzadas, defectos o errores durante la separación de los cromosomas o no disyunción, entre otras, generándose diferentes tipos de daño en el ADN incluyendo la presencia de mutaciones (Mohamed et al., 2017). Los estudios en Genética Toxicológica se orientan a cumplir dos objetivos básicos: a) implementar metodologías de ensayo para la evaluación de riesgo, definiendo el impacto nocivo

de los agentes genotóxicos presentes en el ambiente y, b) elucidar la relación entre los mecanismos de genotoxicidad y la iniciación del proceso de carcinogénesis (Mudry y Carballo, 2006).

Los estudios de genotoxicidad pueden realizarse empleando diferentes tipos de matrices bióticas como sistemas *in vitro* e *in vivo* y son diseñados con el fin de identificar cualquier sustancia o compuesto que tenga la capacidad de inducir un efecto perjudicial sobre el material genético de manera directa o indirecta mediante diferentes tipos de mecanismos de acción (Mohamed et al., 2017). La fijación permanente del daño en el ADN genera el desarrollo de mutaciones a nivel génico, así como daño a nivel cromosómico, tanto estructural como numérico. La visualización y cuantificación de estas alteraciones se pueden llevar a cabo mediante la realización de diferentes tipos de pruebas o bioensayos, los cuales poseen un rol importante al poder predecir si un compuesto determinado tiene el potencial de causar genotoxicidad, y en consecuencia desencadenar un proceso de carcinogénesis. Poseen la ventaja de poder ser reproducidos, y dependiendo el tipo de tejido, el daño puede o no ser reparado. Cuando el proceso de reparación celular se altera, puede desencadenarse un proceso de carcinogénesis, teratogénesis y/o apoptosis (Mudry y Carballo, 2006). Ningún ensayo individual tiene la capacidad de detectar todos los agentes genotóxicos ni todos los tipos de daño genético inducido por un agente xenobiótico, por lo que resulta necesario emplear un conjunto de bioensayos que abarquen diferentes sistemas biológicos y diferentes biomarcadores de daño genético que permitan asegurar que la mayoría de los agentes puedan ser detectados (Soriano Tárraga, 2009). Las Instituciones Internacionales encargadas de regular el uso de sustancias o productos antes de ser incorporados al consumo masivo, exigen que para clasificar a un xenobiótico como genotóxico son requeridos, de manera jerarquizada, como mínimo tres clases de bioensayos diferentes, donde deben ser incluidos en un primer nivel dos ensayos *in vitro* tales como: a) un ensayo de mutación reversa en sistemas bacterianos (ensayo de Ames) con y sin la presencia de un sistema de activación metabólica y b) un ensayo para la evaluación citogenética de daño a nivel cromosómico en células de mamífero (aberraciones cromosómicas –AC– o ensayo de micronúcleos –MNs–) y/o un ensayo *in vitro* de mutación como el ensayo de linfoma de ratón. Se requieren dos ensayos diferentes debido a que los compuestos estudiados pueden provocar mutaciones génicas puntuales o daño a nivel cromosómico. Por último, se requiere de un ensayo de genotoxicidad en sistemas *in vivo* para el análisis cromosómico (MNs o AC) usando células de médula ósea de mamíferos, en general de ratones o ratas expuestas que estarían indicando en forma indirecta la posibilidad o no de inducción de daño genotóxico en células germinales (Soriano Tárraga, 2009).

Los ensayos diseñados para detectar cambios nocivos en el ADN son capaces de identificar diferentes clases de modificaciones del material genético que abarcan desde alteraciones en la secuencia de bases del ADN, alteraciones a nivel molecular, intercambios génicos entre pares de cromosomas homólogos y no homólogos al igual que diferentes tipos de alteraciones en la integridad de los cromosomas. Existen cuatro niveles de evaluación del daño genético. El nivel primario, o bacteriano o molecular, que detecta mutaciones puntuales empleando ensayos en

diferentes tipos de organismos procariotas. Entre los ensayos utilizados en este nivel se encuentra el test de Ames. El nivel secundario, o celular, donde se emplea un cultivo de células con el objetivo de caracterizar el daño en líneas celulares establecidas, emplean ensayos como el de AC, intercambios de cromátidas hermanas y el de MNs. En el nivel terciario o nivel orgánico, el cual se aplica en plantas y animales, incluido el ser humano, se evalúan exposiciones de tipo ocupacional y accidental. Por último, en el nivel cuaternario o nivel epidemiológico es donde se evalúan los efectos genotóxicos en poblaciones expuestas.

Dentro de los ensayos más comúnmente utilizados en Genética Toxicológica y que serán tratados en este capítulo, se encuentran:

- Ensayo o test de Ames: el punto final evaluado es la mutación génica puntual en una célula bacteriana. Se emplean cepas de *Salmonella Typhimurium* y *Escherichia coli*. Las mutaciones puntuales evaluadas incluyen sustituciones de una única base o deleciones e inserciones de uno o varios pares de bases detectados como cambios en el marco de lectura.
- Ensayo de AC: el punto final evaluado es la inducción de AC tanto estructurales como numéricas.
- Ensayo de linfoma de ratón: los puntos finales evaluados son la inducción de mutaciones génicas y daño cromosómico al mismo tiempo.
- El ensayo de MNs: Es un ensayo que evalúa daño a nivel cromosómico tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*.
- El ensayo cometa (EC o SCGE –single cell gel electrophoresis–): el punto final es la evaluación de rupturas de simple o doble en la molécula de ADN, sitios sensibles al álcali, uniones cruzadas ADN-ADN y ADN-proteína y rupturas de cadena simple asociadas a mecanismos de reparación del ADN (Çavaş, 2017; Singh, 1996). Si bien el EC es una metodología aún no validada internacionalmente, resulta un método económico, rápido y sencillo para evaluar inestabilidad genómica.
- El ensayo del citoma (CBMN -cytokinesis-block micronucleus-): es una adaptación del ensayo de MNs que además de cuantificar la inestabilidad genómica evalúa parámetros de citotoxicidad y proliferación celular.

Principales Ensayos empleados en Genética Toxicológica

Ensayo de Ames

Desarrollado por el Dr. Bruce Ames y colegas a comienzos de 1970 (Ames et al., 1972; 1973; Pillco y de la Peña, 2014), actualmente es uno de los ensayos *in vitro* más utilizados para identificar la capacidad deletérea de un compuesto en células procariotas. Es una herramienta que se emplea para detectar el potencial mutagénico y antimutagénico de químicos y mezclas de los mismos presentes o no en el ambiente, fluidos corporales, alimentos, drogas, agentes físicos,

entre otros. El punto final evaluado es la inducción de mutaciones generadas por sustituciones de una única base o delecciones e inserciones de uno o varios pares de bases detectados como cambios en el marco de lectura en una célula bacteriana.

Para este método, se desarrollaron una serie de cepas de *Salmonella Typhimurium* o *E. coli* auxótrofas para el aminoácido histidina (his) o triptófano (Trp), respectivamente. En *Salmonella Typhimurium* el principio de este ensayo se basa en que, una vez identificada la mutación (de his⁻ → his⁺) la misma se revierte en presencia del xenobiótico a ser estudiado y la célula bacteriana es capaz de volver a sintetizar el aminoácido his (Mohamed et al., 2017). Las cepas bacterianas revertantes son identificadas por su habilidad de crecer en ausencia de este aminoácido. El número de colonias revertantes espontáneas por placa es relativamente constante para una determinada cepa bacteriana. Sin embargo, cuando se agrega un mutágeno a la placa, el número de colonias revertantes aumenta por incremento en el número de mutaciones revertantes inducidas por el agente, generalmente resultando la frecuencia de las mismas directamente relacionada con la dosis del xenobiótico ensayado (Mortelmans y Zeiger, 2000; Pillco y de la Peña, 2014).

Existen diversas cepas de *Salmonella* que se caracterizan por poseer mutaciones en los genes del operón his. Las cepas más utilizadas son aquellas que presentan una mutación en el gen *hisG46* (cepa TA100) y en el gen *hisD3052* (cepa TA98). En la cepa TA100 se produce la reversión de his⁻ → his⁺ por sustitución de una única base en el gen mutado, mientras que en la cepa TA98 la mutación afecta el marco de lectura en una secuencia de pares de bases. Posteriormente, se incorporaron al análisis la detección de otros tipos de mutaciones con el fin de aumentar la sensibilidad del ensayo a diferentes agentes xenobióticos (Mudry y Carballo, 2006). Entre estas, se encuentra la mutación en el gen *rfa*, la cual causa modificaciones en la capa de lipopolisacáridos de la membrana celular bacteriana aumentando la permeabilidad de la pared bacteriana a moléculas más grandes. Además, se ha incluido la mutación en el gen *uvrB*, la cual bloquea el mecanismo de reparación por escisión de bases luego del daño inducido en el ADN e impide a una bacteria reparar este tipo de daño causado al ADN, haciendo que la bacteria sea más sensible a los agentes mutagénicos. Además, la delección en el gen *uvrB* afecta también al gen de la biotina y por ello, las cepas bacterianas se tornan, además, auxótrofas para la vitamina biotina (bio⁻) (Mudry y Carballo, 2006).

Asimismo, en este ensayo es necesario incorporar al conjunto de cepas seleccionadas un complejo exógeno de activación metabólica de mamífero (fracción microsomal S-9), el cual emula las condiciones metabólicas de los mamíferos, capacidad ausente en bacterias. El sistema de activación o fracción S-9 consiste en una fracción sobrenadante de un homogenato microsomal proveniente del hígado de ratas expuestas generalmente al carcinógeno aroclor 1254 o a fenobarbital. La fracción S-9 contiene enzimas del complejo CYP420 y sus isoformas al igual que diferentes tipos de enzimas de la fase II del metabolismo como las transferasas. La presencia de estas enzimas en el complejo permite metabolizar al xenobiótico en estudio. Esta fracción S-9 se coloca en el cultivo bacteriano en presencia del xenobiótico y las células son cultivadas siguiendo los lineamientos generales del ensayo a 35-37 °C durante 48 h, momento en el cual se procede al conteo de las colonias microbianas.

En paralelo al tratamiento con el agente en estudio se realiza un cultivo bacteriano en ausencia de la fracción S-9 y es empleado como control negativo (Figura 7.1.).

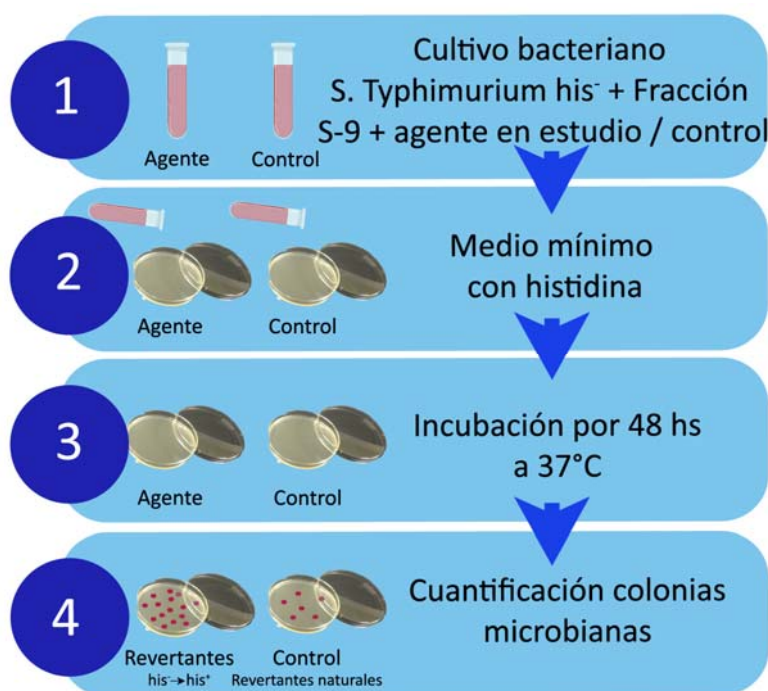


Figura 7.1: Protocolo del ensayo de Ames

El ensayo de Ames es un bioensayo rápido, de bajo costo y fácil de implementar, por lo que en general es empleado para realizar una evaluación inicial de la mutagenicidad de un compuesto con potencial carcinogénico. Es un ensayo versátil y a través de diferentes modificaciones introducidas al protocolo inicial, básicamente con el empleo de diferentes cepas bacterianas, se han podido identificar mutágenos potenciales mediante variaciones experimentales, por ejemplo, el método de preincubación, el ensayo de microsuspensión, el ensayo de punto y el método estándar de incorporación de placa (Pillco y de la Peña, 2014) (Mortelmans y Zeiger, 2000). El ensayo de Ames es requerido o recomendado por agencias regulatorias para aceptar o registrar nuevos químicos, drogas, biocidas, plaguicidas, materiales, entre otros al igual que nuevas combinaciones de los mismos.

Ensayo de aberraciones cromosómicas (AC)

Las AC son alteraciones que pueden ocurrir tanto en el número como en la estructura del complemento cromosómico normal de una especie determinada en estudio. Estas pueden ser generadas de manera espontánea o pueden ser inducidas por diferentes agentes clastogénicos y/o aneugénicos (Mitelman, 1995; Mudry y Carballo, 2006).

Las AC pueden ser inducidas por agentes químicos, físicos o biológicos, o surgir durante el proceso de reparación del ADN, lo cual está altamente influenciado por la estructura de la

cromatina y la actividad transcripcional de la célula afectada. Los agentes químicos (como agentes alquilantes, intercalantes, inhibidores de la reparación del ADN, entre otros), físicos (radiaciones sean ionizantes o no) y biológicos (como el virus SV40, el de Sarcoma de Roux, entre otros) capaces de inducir AC se denominan agentes clastogénicos. El daño puede producirse por la interacción directa de estos agentes con el ADN, o de manera indirecta por interferencias durante el proceso de replicación y reparación de la molécula de ADN. Los agentes clastogénicos pueden tener diferentes mecanismos de acción. Pueden dividirse en agentes dependientes de la fase S, los cuales inducen lesiones que requieren un periodo de síntesis de ADN (fase S del ciclo celular) para expresarse, tales como luz UV, agentes alquilantes y la mayoría de los agentes químicos y por otro lado, los agentes independientes de la fase S, los cuales inducen las lesiones en todas las fases del ciclo celular, incluyendo al período S, tales como la radiación ionizante, agentes citostáticos como la bleomicina y otros compuestos radiomiméticos, entre otros.

Las AC pueden dividirse en dos tipos principales: estructurales y numéricas. Las AC estructurales consisten en reordenamientos de la disposición lineal de los genes sobre los cromosomas que afectan su estructura, forma y tamaño y las AC numéricas implican la pérdida o ganancia de uno o varios cromosomas completos (Lacadena, 1996). Las AC se generan habitualmente como consecuencia de errores que ocurren durante el proceso de duplicación del material genético y/o durante la división celular y que no pueden ser corregidos de manera eficiente por la célula. Asimismo, las AC pueden originarse tanto a nivel de las células somáticas como de células germinales, por lo que pueden ser transmitidas a la descendencia provocando anormalidades cromosómicas hereditarias. Ambos tipos de anormalidades están asociadas con consecuencias negativas en la salud de la población humana y también para otras especies y, en muchos casos, generan anomalías congénitas en recién nacidos e inclusive están directamente vinculadas con el desarrollo de neoplasias (Mohamed y col., 2017).

El ensayo de AC tiene como objetivo identificar los posibles agentes que causan mutaciones estructurales o numéricas en cromosomas o cromátidas de los mismos. Los primeros estudios describiendo los procesos de formación de AC fueron realizados por Perthes usando oocitos de *Ascaris* sp irradiados con rayos X (Perthes, 1904) y por Koernicke en células de raíz de *Vicia faba* y *Pisum sativum* irradiadas con rayos X (Guimarães et al., 2014; Koernicke, 1904). Para la realización de este tipo de ensayo debe seleccionarse una línea celular apropiada, sea primaria o establecida, cuya elección depende de la estabilidad que presente el cariotipo, del número y diversidad de los cromosomas y de la frecuencia de AC espontáneas. En líneas generales, los extendidos celulares son analizados bajo un microscopio óptico convencional de campo claro y una magnificación de 1000X. Se analizan al menos 100 metafases por preparado, en las cuales se registran la frecuencia y el tipo de AC por cada 100 células analizadas, determinándose el porcentaje de células aberrantes, considerando como tal a aquella que presenta por lo menos una AC (Figura 7.2.).



Figura 7.2: Protocolo del ensayo de aberraciones cromosómicas

Las AC estructurales pueden resultar de diversos procesos. Entre las mismas podemos encontrar:

- a) Duplicaciones:** se duplica una sección de un cromosoma, lo cual produce material genético extra. Las duplicaciones pueden abarcar desde una duplicación a nivel génico y la duplicación de segmentos cromosómicos hasta la duplicación de todo el complemento cromosómico como por ejemplo en el caso de las poliploidías. En líneas generales, las duplicaciones no suelen tener una manifestación fenotípica observable a simple vista, sino mediante análisis citogenéticos y moleculares y en muchos casos son de importancia evolutiva.
- b) Deleciones** (o eliminaciones): se pierde o se elimina un segmento del cromosoma o una cantidad muy pequeña de material genético que puede incluir a un único gen. Cuando el segmento cromosómico perdido es terminal, se denomina *deficiencia*, cuando es intersticial, *delección intersticial* o *delección* propiamente dicha. A modo de ejemplo, en la especie humana, una alteración cromosómica provocada por una delección parcial o total del brazo corto del cromosoma 5 origina el síndrome conocido como “maullido de gato” (del francés *cri du chat*).

- c) **Cromosomas en anillo:** consiste en una doble deleción terminal que incluyen ambos telómeros y unión de los mismos dando origen a un cromosoma circular. Pueden presentar o no pérdida de material genético.
- d) **Inserciones:** parte de un cromosoma se ha insertado en una posición inusual dentro del mismo (intracromosómicas) o en otro cromosoma (intercromosómicas).
- e) **Inversiones:** una parte del cromosoma se ha desprendido y reinsertado en el cromosoma, pero con diferente orientación. Deben producirse dos roturas dentro del mismo cromosoma, el segmento gira 180° y finalmente se vuelven a unir. Las inversiones pueden clasificarse en paracéntricas, cuando el segmento invertido no incluye el centrómero, y pericéntricas, cuando el centrómero está incluido en un segmento invertido e implican, generalmente, un cambio en la morfología del cromosoma.
- f) **Translocaciones,** se generan cuando se intercambian segmentos cromosómicos dentro del complemento cromosómico. Hay dos tipos principales de translocaciones, las internas o intracromosómicas, cuando un segmento cromosómico cambia de posición dentro del propio cromosoma como es el caso de las translocaciones internas intraradiales y extraradiales; y las translocaciones intercromosómicas, donde algún segmento cromosómico pasa a situarse en otro cromosoma, y donde podemos incluir a las transposiciones y a las translocaciones recíprocas o intercambios. En una translocación **recíproca**, se da un intercambio de segmentos entre dos cromosomas distintos. En una translocación **no recíproca**, el traspaso del fragmento ocurre únicamente en una dirección. Un tipo muy común de translocación que ocurre en el reino animal son las translocaciones **robertsonianas**, en las que un cromosoma entero se une a otro a nivel del centrómero debido a mecanismos de fusiones y fisiones céntricas. Este tipo de reordenamiento cromosómico en muchos casos ha tenido importantes consecuencias desde el punto de vista evolutivo en numerosos grupos taxonómicos, incluyendo al género *Homo*.

Una variación cromosómica estructural puede afectar a un solo cromosoma, como ocurre en las deleciones, duplicaciones e inversiones, o puede afectar simultáneamente a dos o más cromosomas, como sucede en las translocaciones. Existen distintos tipos de AC estructurales, causadas por rupturas o unión incorrecta de segmentos cromosómicos presentando una reorganización estructural que puede ser balanceada o desbalanceada. Dentro de las reorganizaciones no balanceadas o desequilibradas se pueden incluir a las deleciones, duplicaciones o inserciones de segmentos cromosómicos. Las reorganizaciones balanceadas incluyen regiones cromosómicas invertidas o translocadas (cambios en la ubicación). Dado que la totalidad del ADN del complemento está presente, las reorganizaciones cromosómicas balanceadas pueden pasar desapercibidas y es posible que no resulten en alteraciones fenotípicas visibles salvo en el caso específico que la ruptura cromosómica involucre a un gen funcional ([Figura 7.3.](#)).

En cuanto al otro gran grupo de anomalías, las AC numéricas se definen como aquellos cambios que afectan al número cromosómico normal de una especie en estudio, debido a la pérdida o ganancia de cromosomas completos o pares cromosómicos de la especie.

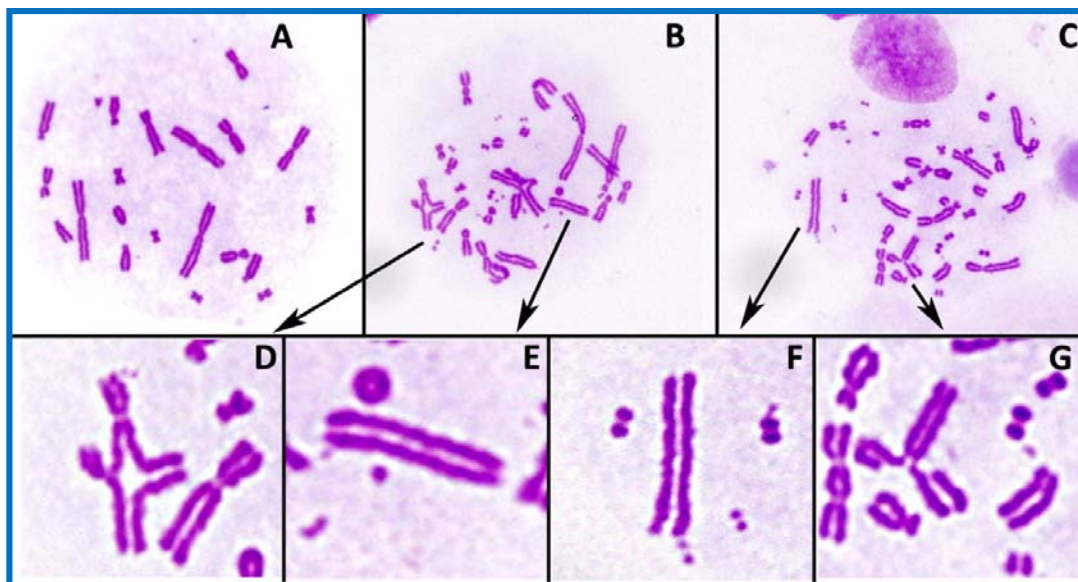


Figura 7.3: Células CHO-K1 en cultivo mostrando: (A) metafase normal (B - C), metafases con aberraciones cromosómicas estructurales, (D) intercambios, (E) anillo y fragmentos acéntricos, (F) Doble diminutos y fragmentos acéntricos y (G) Intercambios, cromosoma dicéntrico, doble diminutos y fragmentos acéntricos. Las figuras D - G son imágenes parciales de B y C destacando distintos ejemplos de AC.

A su vez, las AC numéricas pueden clasificarse en dos grandes grupos, las **euploidías** y las **aneuploidías**. En las euploidías, la célula tiene uno o más juegos completos de cromosomas. Dentro de estas, se encuentran:

- a) **Monoploidías**, en la cual toda célula de un organismo o tejido presenta por un único elemento de cada par de homólogos característicos de las células de los individuos normales de una especie (organismos haploides, n).
- b) **Poliploidías**, en la que los individuos poseen varios juegos completos de cromosomas homólogos (tetraploidías $-3n-$, tetraploidías $-4n-$).

Por otra parte, en las aneuploidías el número de cromosomas difiere del tipo silvestre en parte de su dotación cromosómica, debido a la presencia de uno o varios cromosomas extra o a la ausencia de un elemento. La aneuploidía, ocurrida de forma espontánea, es frecuente en la naturaleza y tiene un carácter evolutivo. La mayor parte de las aneuploidías se originan por un proceso de no disyunción cromosómica durante una de las divisiones meióticas o durante la mitosis. Este error puede ser accidental, estar causado por el incremento de la edad (mayormente en la ovogénesis) o por la exposición a agentes potencialmente aneugénicos, los cuales interfieren con la formación del huso mitótico (Guimarães et al., 2014).

Los individuos normales son disómicos, y los aneuploides se clasifican siguiendo la siguiente terminología:

- a) **Monosomías**, Individuos a los cuales les falta un cromosoma completo. Su dotación cromosómica es $2n-1$. Un ejemplo de monosomía es el síndrome de Turner donde una mujer presenta un único cromosoma X o el mismo está incompleto y fenotípicamente son de menor estatura que el promedio e infértiles.
- b) **Nulisomías**, individuo con ausencia de un par de cromosomas homólogos en su complemento cromosómico. Su dotación cromosómica es $2n-2$.
- c) **Polisomías**, cuando un individuo tiene más de dos cromosomas en lugar de un par. Dentro de estas últimas se encuentran las **trisomías**, que se originan al duplicarse los cromosomas tres veces, **tetrasomías** que se originan al duplicarse cuatro veces, etc. Un ejemplo de una afección causada por una trisomía es el Síndrome de Down, el cual se caracteriza fenotípicamente por diferentes grados de retraso mental y otros problemas de salud. Un individuo con Síndrome de Down tiene tres copias del cromosoma 21 (total o parcial) en lugar de dos, motivo por el cual la afección también se conoce como “trisomía 21” siendo su constitución cromosómica $47, XX/XY, +21 (2n+1)$.

Como podemos observar, la detección temprana de AC constituye un biomarcador fundamental en la toma de decisiones desde el punto de vista clínico en diferentes tipos de enfermedades como síndromes, malformaciones genéticas, diferentes grados de esterilidad y la aparición de procesos cancerosos, entre otros. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la obtención de un resultado positivo en este ensayo no siempre está correlacionado con un proceso de carcinogénesis, ya que un único bioensayo no puede detectar todos los mecanismos que participan en el proceso de tumorigénesis. Por esto, se complementa este ensayo con otros tales como el test de Ames, el test de MNs y/o el test de linfoma de ratón. Adicionalmente, se deben incluir ensayos *in vivo*, ya que algunos agentes son mutagénicos *in vivo* pero no *in vitro*.

Ensayo de mutaciones genéticas en células de mamíferos (ensayo de linfoma de ratón)

Es el ensayo *in vitro* más usado para evaluar eventos mutacionales en mamíferos. Fue desarrollado originalmente por Clive y colaboradores en 1972 (Clive et al., 1972). Evalúa la inducción de mutaciones en el gen timidina quinasa (*Tk*) ubicado en el cromosoma 11 del genoma de ratón y detecta un amplio espectro de daño genético debido a la naturaleza y localización de este gen, evidenciando tanto mutaciones puntuales como mutaciones a nivel cromosómico (Chen et al., 2014). El gen *Tk* codifica para una enzima citosólica fosfotransferasa, involucrada en la vía de recuperación del nucleótido pirimidina. La enzima TK fosforila

deoxitimidina a deoxitimidina 5' fosfato de manera tal que la deoxitimidina pueda ser incorporada al ADN. Varias características de la enzima TK permiten que este ensayo detecte diferentes tipos de mutaciones. Entre ellas, que el gen *Tk* funcional no es necesario para células de cultivo, por lo cual mutantes *Tk* pueden crecer y desarrollarse. Además, las células deficientes en TK pueden ser seleccionadas con el análogo de la pirimidina trifluorotimidina (TFT). Este compuesto, al ser captado por la célula y fosforilado por la TK, origina metabolitos tóxicos que producen muerte celular. Así, las células con la enzima TK no funcional serán resistentes a TFT, ya que serán incapaces de metabolizarla y desarrollarán colonias mutantes; mientras que las células que posean la enzima funcional serán sensibles a TFT y por ende, morirán (Soriano Tárraga, 2009).

Para la realización de este ensayo se utiliza la línea celular comercial de linfoma de ratón L5178Y/ $Tk^{+/-}$ -3.7.2C. Esta línea celular fue elegida por una serie de características que la hacen idónea para ensayos de mutación génica *in vitro*. Entre ellas, presentar crecimiento en suspensión, tiempo de duplicación corto (9-11 h), número estable de cromosomas y alta eficiencia de clonación. Si la enzima TK es normal, incorpora el análogo TFT en el ADN durante la reparación o división celular, conduciendo a la muerte celular. Sólo las células con la mutación del gen *Tk* ($Tk^{-/-}$) sobreviven a su presencia debido a la alteración de las vías de rescate de nucleótidos. Luego de la adición del TFT, las células son típicamente cultivadas por 10-14 días durante los cuales las células $Tk^{-/-}$ forman colonias. Una característica de las colonias mutantes del gen *Tk* es que crecen en colonias de diferentes tamaños. Las colonias grandes de mutantes crecen a una tasa similar a las células *Tk* heterocigotas mientras que las colonias de mutantes pequeñas crecen a una tasa menor. La frecuencia relativa entre los dos tipos de colonias es dependiente del mutágeno. En general, los agentes clastógenos tienden a producir colonias de mutantes pequeñas con bordes irregulares mientras que los agentes que producen mutaciones puntuales o deleciones de pares de bases y no producen rupturas de cromosomas, producen colonias de mayor tamaño y con bordes lisos (Lloyd y Kidd, 2012). Así, el tamaño de las colonias junto con los análisis moleculares pueden revelar el mecanismo mutagénico de acción de los xenobióticos evaluados (Chen et al., 2014).

La guía de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos OECD 476 (OECD, 1997) recomienda que el ensayo se realice en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica, comúnmente la fracción mitocondrial S-9. El periodo de expresión en el locus *Tk* es de 2 días, pero puede extenderse a 3 días si el agente en estudio retrasa el ciclo celular. Luego del tratamiento, las placas mutantes son incubadas de 10-14 días. Pasado este periodo, las colonias pueden ser contadas visualmente o usando un contador automático (Lloyd y Kidd, 2012) (Figura 7.4.).

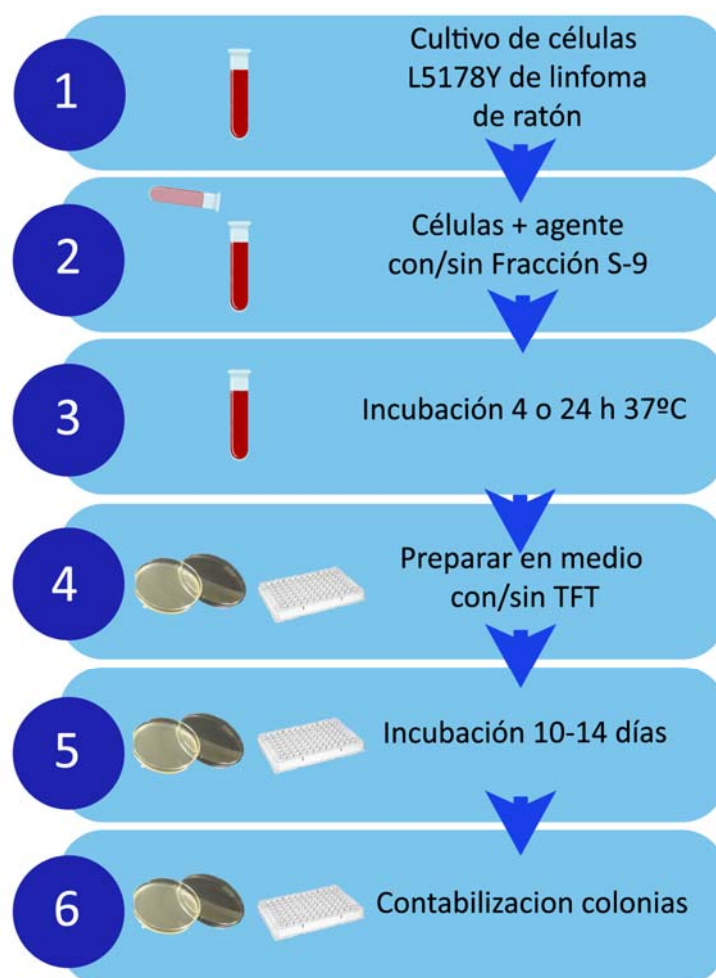


Figura 7.4: Protocolo ensayo de linfoma de ratón

Ensayo cometa (EC)

El ensayo cometa o electroforesis en gel de células individuales es una metodología sensible, rápida, simple y visual utilizada para analizar rupturas en la molécula de ADN de simple o doble cadena, sitios sensibles al álcali, uniones cruzadas ADN-ADN y ADN-proteína y rupturas de cadena simple asociadas a mecanismos de reparación del ADN (Çavaş, 2017; Singh, 1996). El EC fue introducido por primera vez por Ostling y Johanson (Ostling y Johanson, 1984), quienes emplearon una línea celular tumoral de mamíferos irradiada y utilizaron la metodología con una solución de electroforesis a pH neutro que permitió la detección de lesiones de cadena doble en el ADN. Posteriormente, Singh en sus investigaciones sobre el efecto de la radiación empleando rayos X y H₂O₂ desarrolló la variante alcalina de la técnica mediante la incorporación de una solución de pH alcalino (≥ 12) durante la electroforesis a la que son sometidas las muestras. Este cambio permitió adicionar la detección de lesiones de cadena simple y sitios sensibles al álcali (Singh et al., 1988). Actualmente este bioensayo

puede ser empleado en cualquier célula eucariótica aislada o suspensión nuclear, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Ha sido ampliamente utilizado en cultivos celulares, en células de animales y humanas (células sanguíneas, células pertenecientes a diferentes tejidos y esperma), células de la hemolinfa de moluscos e insectos, en levaduras y en tejidos vegetales (Azqueta y Collins, 2014).

Esta técnica posee la ventaja de poder ser aplicada a cualquier población de células eucariotas, sin tener en cuenta su actividad mitótica o el período del ciclo celular donde se encontraban en el momento de la exposición al xenobiótico. Más aún, otra ventaja es que sólo se requiere de una pequeña cantidad de tejido o de células de un tejido y adicionalmente a los métodos de categorización visual del daño, tiene la opción de ser analizada de manera automática utilizando programas de computación. Los resultados pueden ser obtenidos en un lapso breve de análisis por parte de un observador (Azqueta y Collins, 2013; Collins, 2004; Tice et al., 2000). Se utiliza tanto en programas de seguridad regulatoria para la evaluación de productos químicos en relación con la genotoxicidad y en estudios de reparación del ADN, así como para el biomonitorio humano y en el ámbito emergente de la Ecogenotoxicología (Gagné et al., 2014).

Esta técnica permite analizar el daño en el ADN (tal como hemos mencionado e incluyendo daño oxidativo a nivel de bases púricas y/o pirimídicas) inducido por un xenobiótico en células individuales contenidas en una capa de gel de agarosa. Básicamente, las células, luego de la exposición a un tóxico, son resuspendidas en agarosa de punto de fusión bajo la cual es colocada sobre un portaobjetos, entre otras dos capas de agarosa de punto de fusión normal. Posteriormente, las células son lisadas para remover las membranas celulares al igual que las proteínas que se encuentran unidas al ADN, dejando al núcleo desprovisto de su membrana nuclear, tomando la denominación de “nucleoide”. Luego se procede al desenrollamiento del ADN del nucleoide, y luego el mismo es sometido a una electroforesis induciendo a los fragmentos de las cadenas de ADN celular generados por el agente xenobiótico a migrar hacia el polo positivo del campo eléctrico durante el proceso de electroforesis. (Figura 7.5.). En otras palabras, los fragmentos de ADN cargados negativamente migran libremente hacia el ánodo a través de un campo eléctrico en una solución de electroforesis mientras que el ADN no fragmentado (sin carga neta) permanece sin migrar del nucleoide y sigue formando parte del mismo (Azqueta et al., 2017; Çavaş, 2017). Luego de la neutralización y la tinción con un colorante o con un fluorocromo con afinidad por el ADN, la imagen resultante a analizar se asemeja a un cometa, con una zona más definida denominada “cabeza” en la región original del nucleoide y una región conteniendo el ADN fragmentado migrado, la “cola” del nucleoide (Figura 7.6.).



Figura 7.5: Protocolo del ensayo cometa

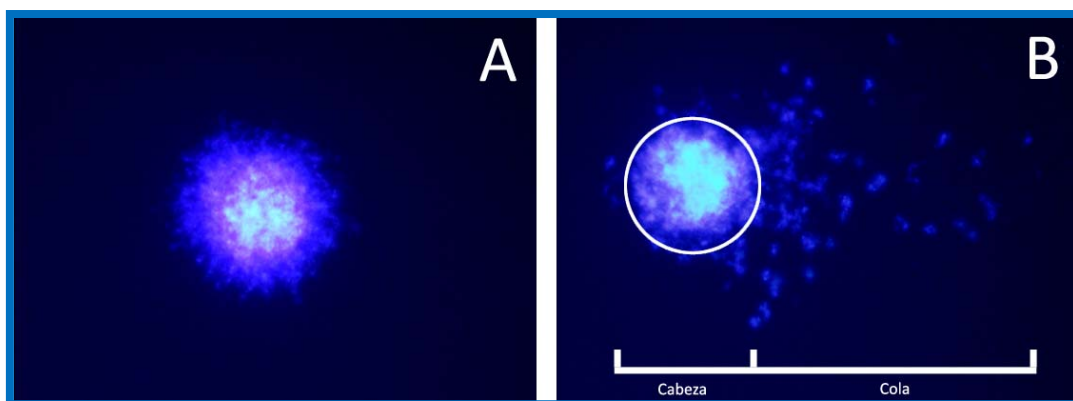


Figura 7.6: Fotografías de nucleoides coloreados con DAPI (A) Nucleoide no dañado (tipo 0). (B) Nucleoide con un alto grado de daño (tipo IV)

La migración del ADN es directamente proporcional al daño que presenta el mismo. En otras palabras, cuanto más lesionado el ADN, mayor el número de fragmentos a migrar y mayor la cola del cometa, pero además cuanto más cortos sean los fragmentos de ADN inducidos, más lejos migrarán durante la electroforesis y por ende, más larga será la distancia de migración del nucleóide, y mayor entonces la cola del cometa. Entre las tinciones más utilizadas se encuentran la impregnación argéntica y el uso de fluorocromos tales como el bromuro de etidio, yoduro de propidio, SybrGreen y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), entre otras (Collins et al., 2008; Cristofolletti et al., 2009; Mustafa et al., 2015; Vera-Candioti et al., 2013).

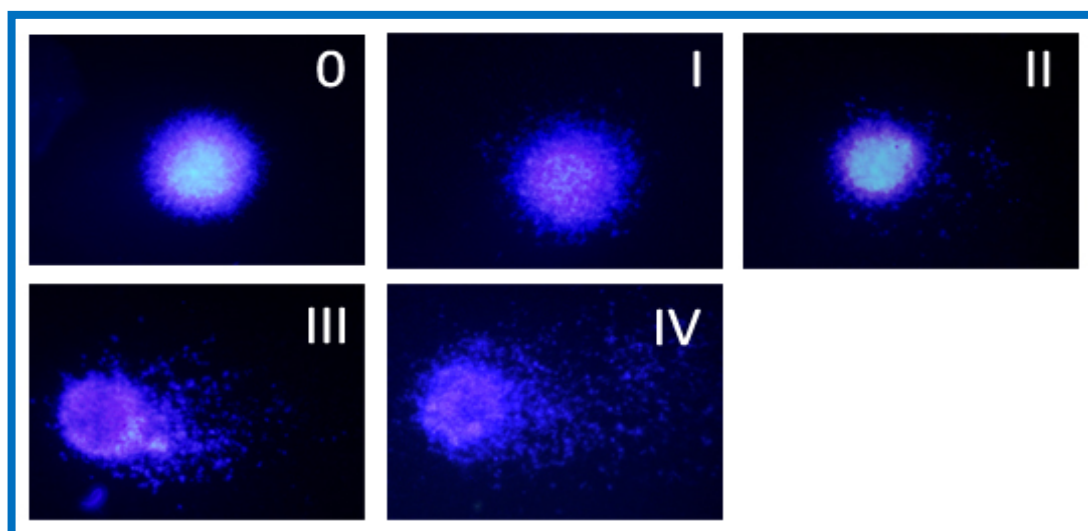


Figura 7.7: Fotografías de nucleóides de eritrocitos del poecílido *Cnesterodon decemmaculatus* con distintos grados de daño. Categorías de daño Tipo 0-I nucleóides no dañados. Nucleóides II-IV nucleóides con daño creciente.

Una de las maneras clásicas de cuantificación visual del daño en el ADN fue propuesta por Çavaş y Konen (2007). La misma se realiza y se expresa en unidades arbitrarias basadas en la clasificación de los nucleóides en cinco categorías (categorías 0-IV) de acuerdo a la extensión de la cola. Según la misma, los nucleóides tipo 0-I agrupan a los nucleóides no dañados, los tipo II incluyen a los de nivel de daño leve, los de tipo III a aquellos nucleóides que presentan un nivel de daño medio mientras que los nucleóides tipo IV incluyen a los que presentan un grado de daño máximo (Figura 7.7.). En el análisis automatizado de los cometas, los programas de computación, entre los que pueden ser mencionados el *OpenComet* y *NIH image* permiten el cálculo de más de 20 parámetros usando imágenes obtenidas en el momento de su estimación o capturadas con anterioridad (Çavaş, 2017). Entre los parámetros obtenidos por este tipo de programas de computación para expresar el nivel de daño en el ADN se encuentran el largo de la cola, el porcentaje de ADN contenido en la cola y el momento *Olive*. El largo de la cola, generalmente, incluye la distancia de migración del ADN desde el nucleóide. El porcentaje de ADN de la cola se calcula sustrayendo de la cantidad total del ADN del nucleóide el porcentaje de ADN presente en la cabeza del cometa. Finalmente, el momento *Olive* se define como el producto del largo de la cola y la fracción total de ADN presente en la misma (Dogan y Can, 2011; Martínez-Paz et al., 2013). Los resultados también pueden expresarse calculando un índice, el Índice de Daño Genético (IDG) propuesto por Pitarque y col. (1999), el cual pondera la prevalencia de cada clase de nucleóide según la siguiente fórmula:

$$IDG = (1xI + 2xII + 3xIII + 4xIV) / N_{(0-IV)}$$

Donde, 0-IV representan las clases de nucleoides y $N_{(0-IV)}$ representa el total de los nucleoides analizados.

Diferentes variantes del ensayo cometa han sido descritas, entre ellas la combinación con isotiocianato de fluoresceína (FISH), la electroforesis de campo variable y la inclusión de endonucleasas de restricción (Azqueta et al., 2017; Kushwaha et al., 2011; Mondal y Guo, 2017; Sorensen et al., 2005). Esta última es una de las variantes mundialmente adoptadas, y propone la inclusión de enzimas que detectan lesiones específicas del ADN. El grupo de investigación de Collins y colaboradores fueron los primeros en emplear endonucleasas de restricción en el ensayo cometa para aumentar su sensibilidad. El protocolo incluye la incubación de las células lisadas con enzimas de restricción capaces de reconocer específicamente diferentes tipos de bases dañadas en la molécula de ADN (Azqueta y Collins, 2013). En esta modificación metodológica, luego de la etapa de lisis celular empleada en el protocolo general de la metodología del ensayo cometa, los geles de agarosa conteniendo los nucleoides son incubados con las endonucleasas específicas que no sólo reconocen lesiones en las bases del ADN, sino que introducen cortes de cadena a nivel del sitio reconocido, originando de este modo sitios apurínicos. Por consiguiente, de existir bases dañadas reconocidas por la endonucleasa específica, la misma no solo reconoce dichos sitios, sino que produce los cortes en la cadena de ADN, lo cual se traduce en un incremento en número de fragmentos de ADN, efecto que será observado en la práctica como una mayor densidad (mayor momento) de la cola del nucleoide debido al aumento del número de fragmentos, o a una mayor longitud de la misma dada por una mayor migración de fragmentos de menor tamaño. Las enzimas más utilizadas son la Endonucleasa III (Endo III) para detectar pirimidinas oxidadas y la formamidopirimidina-ADN glicosilasa (FPG) para detectar purinas oxidadas (mayormente 8-oxo-guanina) y formamidopirimidinas que resultan de la ruptura de purinas oxidadas o alquiladas (Collins, 2004; Collins et al., 1996). Asimismo, entre la lista de enzimas utilizadas, pueden mencionarse entre otras, a la T4 endonucleasa V (T4endoV), también conocida como T4 PDG, caracterizada por detectar dímeros ciclobutano de pirimidinas y la AlkA para detectar bases alquiladas, entre ellas residuos de 3-metilaldenina (Azqueta y Collins, 2014). Esta variante metodológica del EC clásico ha permitido dilucidar, en parte, los posibles mecanismos de acción de algunos compuestos genotóxicos, investigar enfermedades derivadas de la situación de estrés oxidativo, evaluar estrés oxidativo generado por ejercicio en el hombre o en animales, estudiar efectos antioxidantes de compuestos presentes en la dieta así como en la evaluación del estado sanitario ambiental (Azqueta et al., 2017).

Ensayo de micronúcleos (MNs)

Esta metodología permite la evaluación del daño inducido por un xenobiótico a nivel cromosómico, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. El mismo puede ser determinado en distintos tipos de células proliferantes mediante la inducción de daño clastogénico o aneugénico.

Fue descripto por primera vez por Evans y col. (1959) quienes utilizaron como modelo experimental raíces de *Vicia faba* expuestas a radiación ionizante. Esta técnica se basa en analizar la presencia

de macrolesiones a nivel de la molécula de ADN donde el material genético desprendido da origen a pequeños núcleos denominados micronúcleos (MNs). Estos MNs, a nivel microscópico, son detectados en células en interfase celular como pequeñas porciones de material extranuclear, en otras palabras no contenido en el núcleo celular, y siempre rodeados por membrana nuclear. El MN debe ser considerado como marcador o indicador indirecto de daño cromosómico. El mismo puede originarse por una o varias rupturas de la molécula de ADN la cual alcanza su máximo grado de compactación de la cromatina, que como sabemos acontece durante la metafase mitótica, dando lugar a la formación de un uno o a varios fragmento(s) cromosómico(s) acéntrico(s) (efecto clastogénico) o pueden estar formados por cromátidas enteras o por un cromosoma completo el cual no migró normalmente durante la anafase-telofase celular por alteraciones acontecidas en el aparato mitótico (efecto aneugénico) (Çavaş, 2017; Fenech et al., 2011). Por este motivo, requieren al menos una división celular para expresarse y poder ser visualizados con una tinción convencional nuclear en el estado de interfase celular. Adicionalmente, pueden ser observados y por consiguiente, cuantificados en diferentes modelos experimentales, incluyendo células vegetales y animales, e inclusive humanas, empleando distintos tipos celulares, dependiendo del modo de acción del agente a caracterizar y del objetivo del estudio, con la única salvedad que las mismas tienen que ser células proliferantes (Mudry y Carballo, 2006). (Figura 7.8.).



Figura 7.8: Protocolo del ensayo de MNs

Los criterios establecidos y mundialmente aceptados para identificar un MN en una célula interfásica son los propuestos por Fenech (2000; 2007). Los mismos indican que los MNs para ser considerados como tales deben tener una morfología redondeada, un diámetro menor a 1/3

respecto al núcleo principal, no ser refringentes, mostrar menor o la misma intensidad en la coloración que el núcleo principal, no estar conectados al núcleo principal, no estar solapados al núcleo principal, tener los bordes definidos y bien diferenciados del núcleo principal al igual que no existir más de 6 MNs en una misma célula (Figura 7.9).

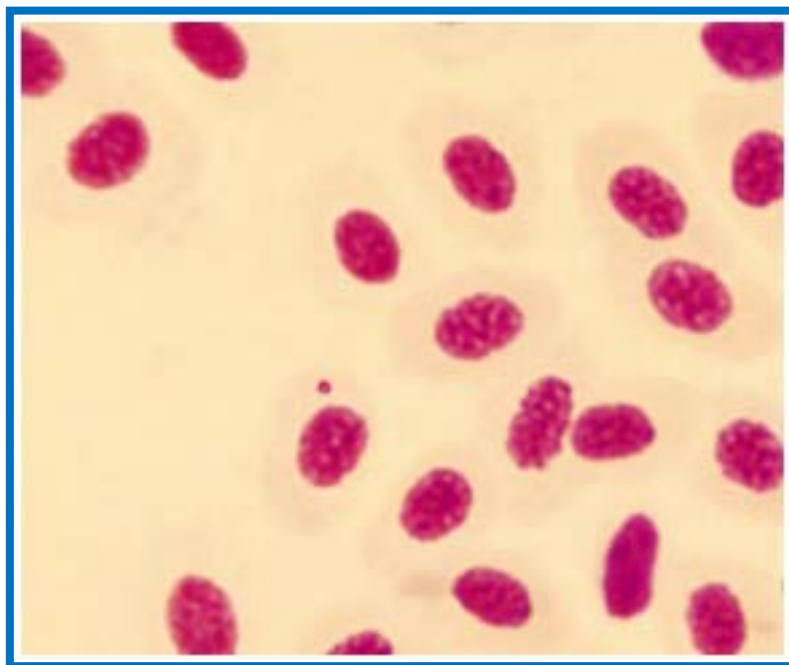


Figura 7.9: Extendido sanguíneo de peces mostrando un Micronúcleo.

Particularmente, el análisis de frecuencia de MNs en eritrocitos circulantes de organismos acuáticos expuestos a diferentes tóxicos se ha tornado una metodología aceptada y utilizada ampliamente a nivel mundial dentro del campo de la Genotoxicología (Cavaş y Ergene-Gözükara, 2003; Gökalp Muranli y Güner, 2011; Pérez-Iglesias et al., 2014; Ruiz de Arcaute et al., 2014; 2016; Soloneski y Larramendy, 2017). Aún más, se ha convertido en una herramienta de estudio obligatoria durante el proceso de aprobación de productos farmacéuticos, químicos, plaguicidas, diferentes tipos de materiales, entre otros (Mudry y Carballo, 2006). Entre las tinciones más utilizadas para este método se encuentran la coloración con Giemsa, coloración con naranja de acridina (NAcr), DAPI, ioduro de propidio, entre otras (Çavaş, 2017). El uso de Giemsa, formado por una mezcla de colorantes neutros y básicos, es sin lugar a dudas la metodología de tinción más extendida, aunque con este método, algunos artefactos no conformados por material nuclear pueden ser teñidos y confundidos con MNs por un observador no experimentado. Por otro lado, la NAcr es un fluorocromo catiónico específico para ácidos nucleicos, vale decir pone en evidencia tanto ADN como ARN, siendo considerada por consiguiente, una técnica más confiable que la de Giemsa, aunque con la desventaja de precisar equipamiento más sofisticado, como microscopía con epifluorescencia y el empleo de filtros de excitación adecuados en el equipo empleado.

Asimismo, cabe destacarse que, aun no existiendo en la literatura un consenso universal para su significancia y clasificación, se describieron y se propusieron diversas anomalías nucleares (AN), diferentes a los MNs, como signo de daño inducido en el material genético por diferentes agentes xenobióticos (Carrasco et al., 1990). Las mismas pueden resumirse en las siguientes variedades o tipos designadas vernáculamente como “otras alteraciones nucleares” siguiendo los criterios establecidos por diversos autores (Cavaş y Ergene-Gözükara, 2003; Nikoloff et al., 2014; Strunjak-Perovic et al., 2009). Dentro de dichas alteraciones nucleares pueden incluirse a las células binucleadas (CB), cuando la misma presenta dos núcleos de tamaño similar con su membrana nuclear intacta; brotes nucleares (BN - *buds*), cuando el núcleo celular presenta una pequeña evaginación de material genético que sobresale de la membrana nuclear. Esta evaginación contiene en su interior eucromatina y se encuentra unida al núcleo por un pedúnculo de material genético cuyo ancho puede ser ligeramente menor al ancho del BN o mucho más delgado, dependiendo del momento del proceso de extrusión del material; núcleos lobulados (NL), cuando el núcleo de la célula presenta una o más evaginaciones de la membrana nuclear, más grandes que los BN y escotaduras nucleares (EN), cuando los núcleos presentan vacuolas y una invaginación pronunciada de su membrana nuclear (Cavaş y Ergene-Gözükara, 2003; Nikoloff et al., 2014; Pérez-Iglesias et al., 2015; Ruiz de Arcaute et al., 2014; 2016; Strunjak-Perovic et al., 2009) (Figura 7.10).

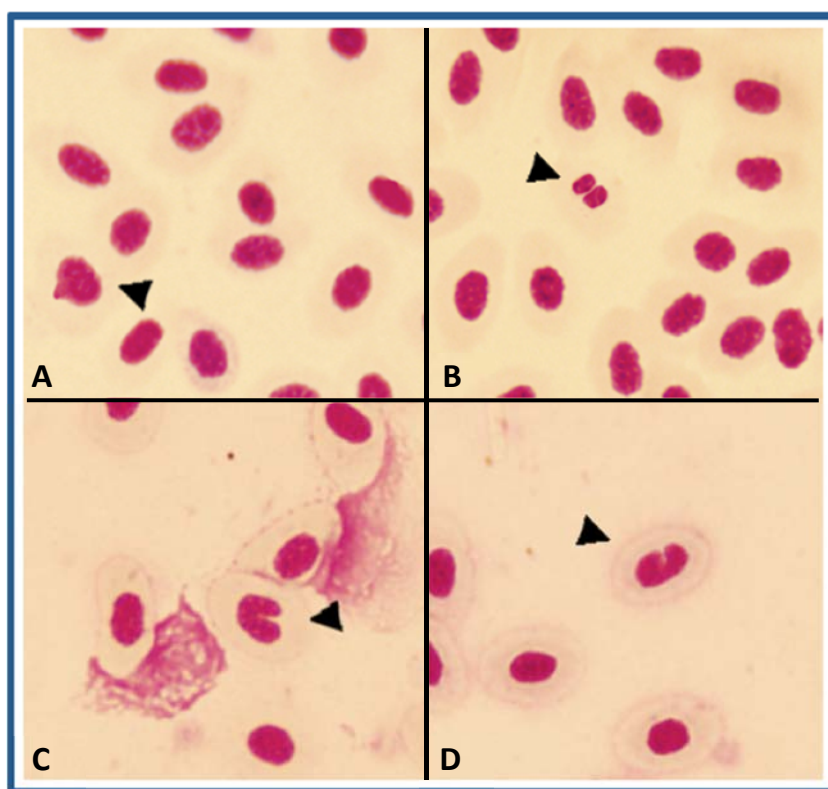


Figura 7.10: Anormalidades nucleares (cabeza de flecha). (A) Brote nuclear (B) Célula binucleada (C) Célula lobulada y (D) Escotadura nuclear.

Se ha sugerido que la aparición de algunas ANs y MNs son resultado de eventos genotóxicos relacionados con diferentes causas tales como problemas durante la segregación de los cromosomas que se encuentran alineados de manera incorrecta en la placa metafásica o que permanecen unidos entre ellos durante la división celular (Çavaş, 2017; Seriani et al., 2012; Shimizu et al., 1998), aparición de aneuploidías (Fernandes et al., 2007) y generación de procesos de degradación celular (Ateeq et al., 2002). También se ha sugerido que los NLs y BNs podrían originarse durante el proceso de eliminación de exceso ADN generado por amplificación génica a través de ciclo de ruptura-fusión-puente. Este ADN en exceso se ubicaría en la periferia del núcleo y sería posteriormente eliminado por un mecanismo de extrusión, formando un MN o, en el caso de que este proceso se vea interrumpido, la generación de un BN o un NL. Análisis estadísticos probaron una correlación positiva entre la aparición de BNs y la formación de MNs (Çavaş, 2017). Fernandes y col. (2007) han sugerido que las CBs y ENs podrían ser indicadores de xenobióticos que actuarían mediante un mecanismo aneugénico. Se ha reportado, asimismo, que este efecto podría suceder por fallas durante la polimerización de las tubulinas y en consecuencia, la generación de alteraciones a nivel del aparato mitótico (Walia et al., 2013). Adicionalmente, Ateeq y col. (2002) sugirieron que los xenobióticos generan condiciones hipóxicas que resultan en la disminución de los niveles de ATP, conduciendo a malformaciones morfológicas en los eritrocitos por alteraciones en el ciclo normal de polimerización de tubulinas, proteínas motrices y rectoras del aparato mitótico.

Ensayo del citoma (CBMN)

Previamente se mencionó que el ensayo de MNs puede llevarse a cabo tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*. En los sistemas *in vitro* se debe demostrar que las células en cultivo han atravesado al menos un ciclo de duplicación celular, condición necesaria como hemos mencionado anteriormente para la observación y estudio de MNs (Elhajouji y Lukamowicz-Rajska, 2013). Una adaptación del ensayo de MNs fue la realizada en 1985 por Fenech y Morley (1985), quienes desarrollaron una metodología conocida como “técnica del bloqueo de la citocinesis” (CBMN, por sus siglas en inglés *cytokinesis-block micronucleus*), en la cual se introduce dentro del sistema de cultivo un alcaloide de origen fúngico, la citocalasina-B, derivada del hongo *Helminthosporium dematioideum*. La citocalasina-B tiene la propiedad de inhibir la polimerización de los filamentos de actina que, junto a los filamentos de miosina, participan en la formación del anillo contráctil necesario para separación de las células hijas al final de la mitosis celular (Zalcain et al., 2005), impidiendo de esta manera, el avance de la citocinesis durante la duplicación celular. En otras palabras, se impide la división del citoplasma pero no la nuclear. El concepto de “citoma” implica que cada célula en el sistema estudiado es registrada citológicamente por su estado de viabilidad (células viables, apoptóticas y necróticas), por su estado mitótico (mononucleadas, binucleadas, trinucleadas etc.) y por su estado de inestabilidad cromosómica (presencia de MNs, BNs, puentes nucleares etc.). Por esta razón es apropiado referirnos a esta técnica

como ensayo MN-citoma con bloqueo de citocinesis (Fenech, 2007). Esta metodología permite entonces diferenciar en las preparaciones la presencia de células binucleadas debido a que no se produce la separación de las dos células hijas y establecer en ellas la cantidad y la frecuencia de MNs (Fenech, 2007).

Además, la aplicación del CBMN posibilita observar efectos citostáticos mediante el registro de la proporción de células mononucleadas, que son aquellas que no se duplicaron durante su tiempo de permanencia en condiciones de cultivo, células trinucleadas, tetranucleadas al igual que células polinucleadas -que se duplicaron dos o más veces-. Por otra parte, la aplicación del CBMN permite reconocer poblaciones celulares que se encuentran en vías de apoptosis y necrosis, así como una amplia gama de lesiones cromosómicas, en particular roturas, reordenamientos cromosómicos, pérdidas de cromosomas y procesos de no disyunción. Los puentes nucleoplásmicos (NPBs de sus siglas en inglés, *nucleoplasmic bridges*) (Figura 7.11) son un biomarcador de la presencia de cromosomas dicéntricos, generados como resultado de fusiones teloméricas o debido a la generación de fallas durante los procesos de reparación de la doble hebra de ADN. Los NPBs se forman cuando los centrómeros de los cromosomas dicéntricos son traccionados hacia los polos opuestos de las células hijas durante la anafase celular. La célula atraviesa rápidamente la anafase-telofase, completando finalmente la citocinesis, la cual resulta en la ruptura de los puentes nucleoplásmicos como consecuencia de la separación de las células hijas. Los NPBs pueden visualizarse y registrarse gracias al desarrollo del ensayo de citoma. Al estar inhibida la citocinesis, el puente dicéntrico formado durante la anafase permanece intacto, pudiendo observarse como un fragmento de cromatina continua entre las células binucleadas. El CBMN permite además la detección de brotes nucleares, conocidos también como *buds* nucleares (BNs) que, como se mencionara anteriormente, están relacionados con procesos de amplificación génica nuclear como estimación de procesos de inestabilidad genómica (Fenech, 2007). Un protocolo generalizado de esta metodología puede verse en la Figura 7.11. En cuanto a la incorporación de la citocalasina-B, existen dos métodos para realizarla: el método secuencial y el simultáneo. En el caso del método secuencial, se expone el cultivo celular al xenobiótico en estudio, posteriormente al tratamiento se retira el compuesto del sistema de cultivo y se realiza la incorporación de la citocalasina-B. Este método es empleado en los casos en los cuales se sospeche que la citocalasina-B interfiere con la incorporación de la sustancia a evaluar (como es el caso de la mayoría de los nanomateriales). En el método simultáneo, la citocalasina-B es aplicada al cultivo al mismo tiempo que el xenobiótico bajo estudio. Esta versión del CBMN es la más utilizada comúnmente y demanda una menor cantidad de tiempo de procesamiento (Manshian et al., 2013). Los MNs pueden ser detectados utilizando diferentes tinciones para ADN, como hemos mencionado en el acápite anterior, y su frecuencia puede ser cuantificada de manera directa microscópicamente o de manera indirecta por citometría de flujo (Angel Castañeda, 2012).

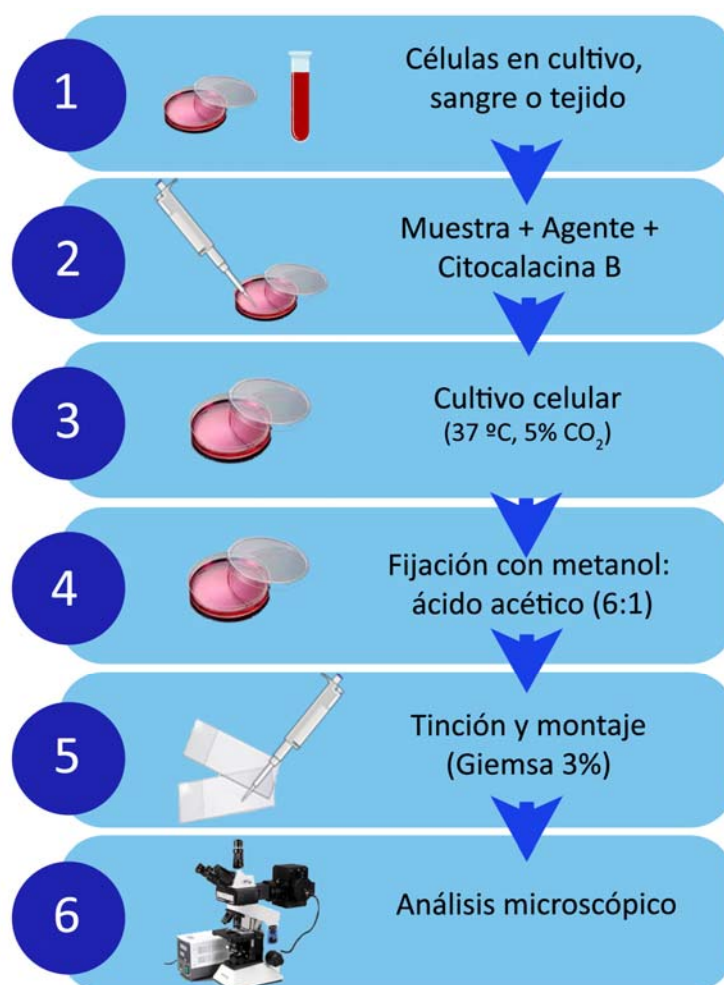


Figura 7.11: Protocolo básico mostrando el ensayo del citoma

Un aporte al esclarecimiento del origen de la formación de MNs es el uso de metodologías de inmunodetección usando anticuerpos CREST (de sus siglas en inglés, Calcinosis, Fenómeno de Raynaud, Dismotilidad Esofágica, Esclerodactilia y Telangientasia). Los pacientes con síndrome de CREST producen una clase particular de autoanticuerpos denominados anticuerpos anticentromero (ACA). Estos anticuerpos se caracterizan por reaccionar contra proteínas que conforman el cinetocoro, íntimamente asociado a los centrómeros de los cromosomas del propio individuo, por lo que también reciben el nombre de anticuerpos anticinetocoro (Brenner et al., 1981; Kuramoto et al., 2017; Moroi et al., 1980). Empleando la técnica de inmunofluorescencia indirecta se demostró que ACA presentes en el suero de pacientes con síndrome CREST tienen la capacidad de reconocer y acoplarse a cinetocoros de diversos tipos celulares de mamíferos, dado que su antígeno es un componente nuclear altamente conservado en la escala biológica (Brenner et al., 1981; Moroi et al., 1980). Así, utilizando la tinción con anticuerpos anticinetocoro se puede identificar la presencia o ausencia de centrómeros en los MNs y clasificarlos según el origen del MN en Mn de origen clastógeno y/o aneugénico. Aquéllos MNs que estén formados por uno o más cromosomas serán inmunomarcados con el ACA, poniéndose en evidencia la presencia de centrómeros

dentro del material genético que lo compone. Un MN se clasifica como CREST-positivo cuando se puede observar al menos una marca fluorescente en el mismo, mientras que se clasifica como CREST-negativo cuando no se observa una marca fluorescente dentro de los límites del MN. La visualización de un MN con marcación CREST-positiva revela que el MN estaría compuesto por al menos un cromosoma que mantiene su centrómero y es indicio de que el xenobiótico ha generado un daño en el ADN mediante un efecto aneugénico, mientras que una reacción CREST-negativa indicaría que el MN está conformado por fragmentos cromosómicos que carecen de centrómeros, originados por un efecto clastogénico (González et al., 2011; Miller y Adler, 1990; Olivero, 2008; Parry et al., 2002).

Otra herramienta comúnmente empleada en conjunto con el CBMN que también colabora en la determinación del origen de los MNs es la técnica de hibridación *in situ*. La hibridación *in situ* es una técnica usada para localizar y detectar secuencias específicas de ARN o ADN tanto en células como en secciones de tejido o en tejidos enteros. El principio básico del método es la unión de una hebra simple de ADN o ARN a su secuencia complementaria en cromosomas en metafase o en núcleos interfásicos. Cuando se desea llevar a cabo la hibridación entre hebras de ADN, estas deben estar en su conformación de hebra simple, por lo tanto, la sonda de ADN y el ADN objetivo deben estar desnaturalizados. Con el fin de detectar la sonda ésta es etiquetada por medio de la incorporación a la misma de radioisótopos o de moléculas no isotópicas (fluorescentes y no fluorescentes), como por ejemplo biotina y fluoresceína, entre otras. Las etiquetas radioisotópicas son observadas por medio de autoradiografías con una película fotográfica específica (*stripping film*) o con una emulsión fotográfica líquida. Las etiquetas no isotópicas son visualizadas por medio de técnicas de histoquímica o inmunohistoquímica (Jensen, 2014).

Existen distintos tipos de hibridación *in situ*: PCR con hibridación *in situ*, hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), multicolor FISH e hibridación *in situ* con cromógenos (CISH) (Decordier y Kirsch-Volders, 2013; Jensen, 2014). A lo largo de las dos últimas décadas la hibridación *in situ* con fluorescencia se ha ido consolidando como una de las técnicas de tinción citoquímicas más empleadas, dada su versatilidad y sensibilidad (Nath y Johnson, 2000). Esta técnica citogenética-molecular emplea sondas de ADN marcadas con moléculas fluorescentes, que forman un híbrido con una secuencia complementaria objetivo en el ADN de la muestra en estudio. La señal de la sonda es detectada mediante microscopía de fluorescencia, y para cada muestra de ADN se determina si presenta o carece de dicha señal. Existen 3 tipos de sondas: específicas de un locus, sondas de secuencias repetitivas de ADN (centroméricas y teloméricas) y sondas que marcan cromosomas completos (de pintado cromosómico). Cuando se emplea esta técnica en conjunto con el CBMN, se pueden utilizar sondas centroméricas (que marcan la región del centrómero) para determinar el tipo de efecto ejercido por un mutágeno. Si además se emplean sondas de pintado cromosómico, se puede determinar que cromosoma(s) o fragmentos de cromosomas particulares están involucrados en la formación del MN. Esta técnica presenta alta sensibilidad y especificidad, dado que pone en evidencia la partici-

pación de determinados cromosomas o parte de los mismos en el origen de un MN bajo estudio. Esta última ventaja supera una limitación importante de la citogenética convencional, la necesidad de obtener las células en metafase para realizar un estudio detallado (Decordier y Kirsch-Volders, 2013; Lavaut Sánchez et al., 2016).

Antecedentes del empleo de algunos de los biomarcadores mencionados

En la actualidad, los agroquímicos representan una de las fuentes más importantes de contaminación a nivel mundial. Los avances obtenidos en el área de la Genética Toxicológica han permitido la realización de evaluaciones con el fin de monitorear los efectos inducidos por distintos xenobióticos en los organismos expuestos. Uno de los objetivos principales de nuestro laboratorio es y ha sido evaluar la genotoxicidad inducida por distintos principios activos y formulaciones comerciales de agroquímicos empleados comúnmente en el agro argentino en células de vertebrados, tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*.

Mediante la metodología del EC se evaluaron los efectos genotóxicos inducidos por el insecticida imazetapir tanto como principio activo (p.a.) como en su formulado comercial Pivot®. Los resultados demostraron su capacidad para inducir rupturas en la cadena de ADN en células CHO-K1 (células provenientes de ovario de hámster chino) luego de la exposición *in vitro* a concentraciones de 0,1 µg/ml (Soloneski et al., 2017). Resultados similares fueron obtenidos en ensayos *in vivo* empleando el formulado comercial Pivot® en células circulantes sanguíneas provenientes de larvas de los anuros nativos *Hypsiboas pulchellus* (Pérez-Iglesias et al., 2015) y *Rhinella arenarum* (Carvalho et al., 2019), evidenciando inducción de daño en el ADN a concentraciones de 0,39 y 7,82 mg/L, respectivamente para cada especie.

Resultados similares fueron obtenidos con el antiparasitario ivermectina y su formulado comercial Ivomec® en células de la línea de mamífero CHO-K1 (Molinari et al., 2012) y la línea celular de insecto *Aedes albopictus* CCL-126™ (Molinari et al., 2010). En ambos estudios se demostró un aumento significativo de rupturas en el ADN luego de la exposición a 50 y a 25-50 µg/ml para las líneas celulares CHO-K1 y CCL-126™, respectivamente.

Cuando se evaluó el herbicida flurocloridona, los resultados obtenidos demostraron que el p.a. y las formulaciones comerciales Twin Pack Gold® y Rainbow® poseen la capacidad de inducir rupturas de cadena simple en el ADN tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. Los ensayos *in vitro* fueron realizados en la línea celular CHO-K1 en concentraciones equivalentes de 1, 5 y 15 µg/ml para flurocloridona, Rainbow® y Twin Pack Gold® (Nikoloff et al., 2014), respectivamente, mientras que en la línea celular HepG2 (células provenientes de hepatocarcinoma humano) en concentraciones de 1 µg/ml tanto para el p.a. como para ambos formulados comerciales (Nikoloff et al., 2014). Los ensayos *in vivo* fueron realizados en estadíos larvales premetamórficos de *R. arenarum* obteniendo resultados positivos con concentraciones equivalentes a 0,71 y 0,74 mg/L de las formulaciones Rainbow® y Twin Pack Gold®, respectivamente (Nikoloff et al., 2014).

La evaluación del fungicida zineb y de su formulación comercial Azzurro® demostró la capacidad de inducir daño genotóxico a concentraciones de 1 y 100 µg/ml tanto para el p.a. como para la formulación comercial, respectivamente empleando como modelo de estudio la línea celular CHO-K1 (Soloneski et al., 2002). Resultados similares fueron obtenidos para los herbicidas auxínicos dicamba y 2,4-D contenido en sus respectivas formulaciones Banvel® y DMA® a concentraciones equivalentes a 2 y 50 µg/ml, respectivamente (González et al., 2005; 2007).

Adicionalmente, se demostró la capacidad de inducir daño genotóxico en el ADN de células sanguíneas provenientes de peces ejercido por el herbicida glifosato. Se evaluaron las formulaciones comerciales Panzer® y Credit® *in vivo* en células circulantes sanguíneas de ejemplares adultos del pez nativo *Cnesterodon decemmaculatus* luego de una exposición aguda, obteniéndose resultados positivos a concentraciones de 3,90 y 22,90 mg/L para las formulaciones Panzer® y Credit®, respectivamente (Vera-Candioti et al., 2013). Adicionalmente la formulación Credit® se evaluó en *R. arenarum*, obteniéndose inducción de daño en una concentración equivalente a 3,91 mg/L (Soloneski et al., 2016). Además, en esta misma especie se evaluó el efecto mezclas de glifosato contenido en la formulación Credit® en combinación con el herbicida dicamba en su formulación comercial Banvel® y de glifosato con el insecticida imazetapir en su formulado comercial Pivot®, observándose resultados positivos a concentraciones de 3,91 + 17,92 mg/L de glifosato y dicamba y de 3,91 + 7,82 mg/L de glifosato e imazetapir (Soloneski et al., 2016).

Asimismo, resultados positivos también fueron observados luego de una exposición aguda (48 y 96 h) en *C. decemmaculatus* mediante la metodología del EC empleando el insecticida organofosforado clorpirifós en sus formulaciones comerciales Lorsban*48E y CPF Zamba® a concentraciones de 0,008 y 0,052 mg/L, respectivamente (Vera-Candioti et al., 2013). Resultados similares fueron observados en la misma especie con el insecticida pirimicarb en sus formulados Aficida® y Patton Flow® a concentraciones de 25 y 22 mg/L, respectivamente (Vera-Candioti et al., 2013); y con los herbicidas auxínicos dicamba y 2,4-D en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA® a concentraciones de 410 y 252 mg/L, respectivamente (Ruiz de Arcaute et al., 2014; 2016). El efecto genotóxico de Banvel® y DMA® también fue evaluado en *C. decemmaculatus* luego de una exposición prolongada, demostrando su capacidad de inducir daño en el ADN a concentraciones de 41 y 25 mg/L (Ruiz de Arcaute et al., 2018). Adicionalmente, el formulado Banvel® fue evaluado en larvas de *R. arenarum* observándose inducción de rupturas de cadena simple a concentraciones de 17,92 mg/L (Soloneski et al., 2016).

Por último, mediante esta metodología se evaluó al insecticida imidacloprid y su formulado comercial Glacoxan Imida® en larvas premetamórficas del anuro *H. pulchellus*, observándose un aumento de daño en el ADN a partir de la concentración equivalente a 15 y 12,5 mg/L para el p.a. y Glacoxan Imida®, respectivamente (Pérez-Iglesias et al., 2014; Ruiz de Arcaute et al., 2014).

Nuestro grupo de trabajo, luego de verificar el potencial genotóxico de los pesticidas imazetapir, dicamba y 2,4-D, aplicó la metodología del EC modificado con enzimas de restricción con el objetivo de obtener información adicional e intentar dilucidar el posible mecanismo de acción por

el cual esos compuestos ejercen su efecto e inducen daño en el ADN. Para ello se realizó, luego del período de lisis celular de las muestras sanguíneas, una incubación con dos enzimas de restricción: Endo III y FPG, que empleadas en combinación con el EC permiten revelar la presencia de bases pirimidínicas o purinas oxidadas, respectivamente. Esta evaluación fue realizada *in vitro* empleando el insecticida imazetapir y su formulación comercial Pivot® en células CHO-K1, observándose un aumento de daño en el ADN a concentraciones de 0,1 µg/ml cuando se emplearon las enzimas FPG y Endo III, demostrando que dicho herbicida induce daño por oxidación tanto de bases púricas como de bases pirimidínicas (Soloneski et al., 2017). Este mismo herbicida fue evaluado mediante esta técnica luego de una exposición aguda *in vivo* con concentraciones equivalentes a 0,39 mg/L empleando larvas de la especie *H. pulchellus*, mediante la cual se pudo comprobar que parte de este daño está producido por oxidación de purinas (tratamiento con FPG). Contrariamente, luego del post tratamiento con Endo III no se registró un aumento significativo en los nucleoides dañados, por lo que el insecticida empleado no induciría la oxidación de bases pirimidínicas (Pérez-Iglesias et al., 2017).

Resultados similares fueron obtenidos cuando se realizó la evaluación de los herbicidas auxínicos dicamba y 2,4-D contenidos en sus formulados comerciales Banvel® y DMA® empleando el poecílido *C. decemmaculatus*. Las concentraciones evaluadas fueron 410 y 252 mg/L de Banvel® y DMA®, respectivamente y los resultados demostraron que parte de este daño estaría producido por oxidación de purinas, que fue evidenciado luego del post tratamiento con FPG (Ruiz de Arcaute et al., 2019). Por otro lado, luego del tratamiento con la enzima Endo III, no se observó un aumento significativo de daño, por lo que estos herbicidas no inducirían daño a través de la oxidación de pirimidinas, al menos en la especie evaluada.

Cuando se empleó el ensayo de MNs para evaluar los efectos mutagénicos inducidos por distintos xenobióticos se reportaron diversos resultados. La inducción de MNs fue observada empleando el herbicida dicamba y su formulado comercial Banvel® en células CHO-K1 en concentraciones de 50 µg/ml (González et al., 2011) e *in vivo* en *C. decemmaculatus* expuestos a concentraciones de 1229 mg/L al formulado comercial Banvel® (Ruiz de Arcaute et al., 2014). Cuando se evaluó el herbicida flurocloridona y sus formulaciones comerciales Rainbow® y Twin Pack Gold® *in vitro* en células CHO-K1 sólo se observó inducción de MNs con la concentración de 5 µg/ml de la formulación Twin Pack Gold®. Dicho aumento de la presencia de MNs no fue observada luego de la exposición a flurocloridona ni a su formulado comercial Rainbow® (Nikoloff et al., 2014). Resultados similares fueron observados empleando el mismo herbicida y formulaciones comerciales en la línea celular HepG2, en la cual sólo se observó inducción de MNs luego de la exposición a 5 µg/ml de la formulación Twin Pack Gold® (Nikoloff et al., 2014). La capacidad de inducir MNs de las formulaciones Rainbow® y Twin Pack Gold® fue evaluada *in vivo* en larvas de *R. arenarum* luego de una exposición de 48 y 96 h, observándose resultados positivos luego de la exposición a 0,71 mg/L de Rainbow® no así luego de la exposición a Twin Pack Gold®.

Adicionalmente se observó inducción de MNs por el herbicida carbofurán y su formulación comercial Furadan® en sistemas *in vitro* empleando la línea celular CHO-K1 a concentraciones equivalentes a 10 y 50 µg/ml para el p.a. y el formulado comercial, respectivamente (Soloneski

et al., 2008). Por otra parte, la capacidad de inducir MNs fue analizada utilizando el fungicida zineb y su formulación comercial Azzurro® en linfocitos humanos *in vitro*, observándose inducción significativa de MNs a concentraciones de 25 µg/ml para ambos compuestos (Soloneski et al., 2002). Cuando se evaluó el herbicida S-metolacoloro y su formulación comercial Twin Pack Gold® en la línea celular HepG2 se observó un aumento significativo en la inducción de MNs únicamente cuando se evaluó el formulado comercial a una concentración de 0,5 µg/ml. Tal incremento no fue observado cuando se evaluó el principio activo S-metolacoloro (Nikoloff et al., 2013).

Resultados positivos empleando el Ensayo de MNs luego de una exposición aguda en el pez *C. decemmaculatus* fueron observados empleando el herbicida glifosato en sus formulaciones comerciales Panzer® y Credit® a concentraciones de 3,90 y 22,90 mg/L, respectivamente (Vera-Candioti et al., 2013); con el insecticida clorpirifós en sus formulados Lorsban® y CPF Zamba® a concentraciones de 0,008 y 0,052 mg/L (Vera-Candioti et al., 2014); con el insecticida pirimicarb en su formulado Aficida® y Patton Flow® a concentraciones de 80 y 22 mg/L (Vera-Candioti et al., 2010; 2013) y con el herbicida auxínico 2,4-D en su formulado comercial DMA® en la concentración equivalente a 252 mg/L (Ruiz de Arcaute et al., 2016). Adicionalmente, cuando este ensayo se empleó utilizando como matriz biótica al anuro *H. pulchellus*, se observaron resultados positivos en inducción de MNs con el insecticida imidacloprid y su formulación comercial Glacoxan Imida® a concentraciones de 15 y 25 mg/L, respectivamente (Pérez-Iglesias et al., 2014; Ruiz de Arcaute et al., 2014); con el insecticida pirimicarb en su formulado Aficida® a concentraciones de 19,51 mg/L y con el herbicida imazetapir en su formulado comercial Pivot H® a concentraciones de 0,39 mg/L, evidenciando su capacidad genotóxica (Pérez-Iglesias et al., 2015).

Adicionalmente se evaluaron otras anormalidades nucleares además de los MNs tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*. Estos estudios demostraron la capacidad de inducir daño genético *in vitro* del herbicida flurocloridona y su formulación comercial Twin Pack Gold® en concentraciones de 1 y 5 µg/ml, respectivamente, en la línea celular CHO-K1 (Nikoloff et al., 2014). Contrariamente, el formulado basado en flurocloridona Rainbow® no fue capaz de inducir anormalidades nucleares en la concentración más alta ensayada de 15 µg/ml. Las formulaciones Rainbow® y Twin Pack Gold® también fueron evaluadas en eritrocitos circulantes del anuro *R. arenarum*, las cuales no aumentaron la incidencia de anormalidades nucleares en las concentraciones ensayadas (Nikoloff et al., 2014).

Cuando se evaluó la capacidad de inducir anormalidades nucleares de los herbicidas dicamba y 2,4-D en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA® en *C. decemmaculatus* se obtuvieron aumentos significativos de la incidencia de anormalidades en las concentraciones 410 y 504 mg/L de dicamba y 2,4-D, respectivamente (Ruiz de Arcaute et al., 2014; 2016).

Por último, se evaluó la inducción de anormalidades nucleares de distintos pesticidas *in vivo* en el anuro *H. pulchellus*. El herbicida imidacloprid fue capaz de ejercer un aumento significativo en la frecuencia de anormalidades nucleares en la concentración de 15 mg/L, no así su formulado comercial Glacoxan Imida® a concentraciones de 12,5 mg/L (Pérez-Iglesias et

al., 2014; Ruiz de Arcaute et al., 2014). Resultados positivos fueron observados con los insecticidas pirimicarb, en su formulado comercial Aficida® e imazetapir en su formulado Pivot H®, en las concentraciones equivalentes a 19,51 y 0,39 mg/L, respectivamente (Natale et al., 2018; Pérez-Iglesias et al., 2015).

Finalmente, de estos estudios se desprende el hecho que un único bioensayo no resulta suficiente como indicador para caracterizar la genotoxicidad de un xenobiótico determinado. Es necesario tanto el empleo de distintos biomarcadores específicos de respuesta temprana como la evaluación teniendo en cuenta diferentes niveles de organización biológica. Estas herramientas nos permiten resolver problemáticas ambientales actuales, tal como la contaminación por el uso indiscriminado de plaguicidas, con la finalidad de intervenir oportunamente antes de que se produzca un daño irreversible. En adición, es importante destacar que nuestros estudios tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* han demostrado los riesgos potenciales a los cuales los organismos se ven sometidos por la exposición a formulaciones comerciales de agroquímicos. Asimismo, demuestran que en muchos de los casos, las formulaciones comerciales de los plaguicidas resultan ser mucho más perjudiciales que el compuesto activo en sí mismo, poniendo en evidencia la presencia de componentes potencialmente genotóxicos y/o citotóxicos dentro de los agentes empleados como aditivos que forman parte del producto comercial los cuales deben ser conjuntamente evaluados.

Bibliografía

- Ames, B. N.; Durston, W. E.; Yamasaki, E. y Lee, F. D. (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 2281-2285.
- Ames, B. N.; Gurney, E. G.; Miller, J. A. y Bartsch, H. (1972). Carcinogens as frameshift mutagens: metabolites and derivatives of 2-acetylaminofluorene and other aromatic amine carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69, 3128-3132.
- Ateeq, B.; Abul Farah, M.; Niamat Ali, M. y Ahmad, W. (2002). Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutation Research*, 518, 135-144.
- Azqueta, A. y Collins, A. R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, 87, 949-968.
- Azqueta, A. y Collins, A. R. (2014). The comet assay: High throughput use of FPG. En L. M. Sierra y I. Gaivão, *Genotoxicity and DNA Repair* (pp. 199-217). New York: Springer.
- Azqueta, A.; Costa-Amaral, I. C. y Collins, A. R. (2017). High-throughput measurement of DNA breaks and oxidised bases with the comet assay. En A. Anderson y A. Dhawan, *The Comet Assay in Toxicology* (pp. 67-92). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

- Brenner, S.; Pepper, D.; Berns, M. W.; Tan, E. y Brinkley, B. R. (1981). Kinetochore structure, duplication, and distribution in mammalian cells: Analysis by human autoantibodies from scleroderma patients. *Journal of Cell Biology*, 91, 95-102.
- Carrasco, K. R.; Tilbury, K. L. y Mayers, M. S. (1990). Assessment of the piscine micronuclei test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminants effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47, 2123-2136.
- Carvalho, W. F.; Ruiz de Arcaute, C.; Pérez-Iglesias, J. M.; Laborde, M. R. R.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2019). DNA damage exerted by mixtures of commercial formulations of glyphosate and imazethapyr herbicides in *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles. *Ecotoxicology*, 28, 367-377.
- Çavaş, T. (2017). The use of fish as model aquatic organisms in genotoxicity studies. Non-traditional aquatic models. En M. Larramendy, *Ecotoxicology and Genotoxicology* (pp. 245-277). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Cavaş, T. y Ergene-Gözükara, S. (2003). Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research* 538, 81-91.
- Cavaş, T. y Könen, S. (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 22, 263-268.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26, 249-261.
- Collins, A. R.; Dusinská, M.; Gedik, C. M. y Stetina, R. (1996). Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives*, 104, 465-469.
- Collins, A. R.; Oscoz, A. A.; Brunborg, G.; Gaivão, I.; Giovannelli, L.; Kruszewski, M.; Smith, C. C. y Stetina, R. (2008). The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis*, 23, 143-151.
- Chen, T.; Guo, X. y Moore, M. M. (2014). The mouse lymphoma assay. En L. M. Sierra y I. Gaivão, *Genotoxicity and DNA Repair* (pp. 115-141). New York: Springer.
- Christofolletti, C. A.; David, J. A. y Fontanetti, C. S. (2009). Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): A methodological comparison. *Genetics and Molecular Biology*, 32, 155-158.
- Decordier, I. y Kirsch-Volders, M. (2013). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique for the micronucleus test. En A. B. Dhawan, M, *Genotoxicity Assessment. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (pp. 237-244). Totowa: Humana Press.
- Dogan, D. y Can, C. (2011). Hematological, biochemical, and behavioral responses of *Oncorhynchus mykiss* to dimethoate. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 951-995.
- Elhajouji, A. y Lukamowicz-Rajska, M. (2013). Flow cytometric determination of micronucleus frequency. En A. B. Dhawan, M, *Genotoxicity Assessment. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (pp. 123-146). Totowa: Humana Press.

- Evans, H. J.; Nearya, G. J. y Williamson, F. S. (1959). The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *International Journal of Radiation Biology*, 1, 216-229.
- Fenech, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, 455, 81-95.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2, 1084-1104.
- Fenech, M.; Kirsch-Volders, M.; Natarajan, A. T.; Surralles, J.; Crott, J. W.; Parry, J.; Norppa, H.; Eastmond, D. A.; Tucker, J. D. y Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26, 125-132.
- Fenech, M. y Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147, 29-36.
- Fernandes, T. C. C.; Mazzeo, D. E. y Marin-Morales, M. (2007). Mechanism of micronuclei formation in poliploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicida. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 252-259.
- Gagné, F.; Lacaze, É.; Bony, S. y Devaux, A. (2014). Genotoxicity. En F. Gagné, *Biochemical Ecotoxicology* (pp. 171-196). London: Elsevier.
- Gökalp Muranli, F. D. y Güner, U. (2011). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Mutation Research*, 726, 104-108.
- González, M.; Soloneski, S.; Reigosa, M. A. y Larramendy, M. (2005). Genotoxicity of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic and a commercial formulation, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt. I. Evaluation of DNA damage and cytogenetic endpoints in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicology In Vitro*, 19, 289-297.
- González, N. V.; Nikoloff, N.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2011). A combination of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay and centromeric identification for evaluation of the genotoxicity of dicamba. *Toxicology Letters*, 207, 204-212.
- González, N. V.; Soloneski, S. y Larramendy, M. (2007). The chlorophenoxy herbicide dicamba and its commercial formulation banvel® induce genotoxicity and cytotoxicity in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutation Research*, 634, 60-68.
- Guimarães, A. P. A.; Guimarães, A. C.; Alcarânta, D. A.; Raimundo Cunha, L.; Lima, P. L.; Vasconcellos, M. C.; Montenegro, R. C.; Soares, B. M.; Amorim, M. M. y Burbano, R. R. (2014). Chromosomal aberration test utilities *in vitro* and *in vivo*. En L. M. Sierra y I. Gaivão, *Genotoxicity and DNA repair* (pp. 115-141). New York: Springer.
- Jensen, E. (2014). Technical review: *In situ* hybridization. *Anatomical Record*, 297, 1349-1353.
- Koernicke, M. (1904). Über die Wirkung von Röntgenstrahlen auf die Keimung und das Wachstum. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 22, 148-155.
- Kuramoto, N.; Ohmura, K.; Ikari, K.; Yano, K.; Furu, M.; Yamakawa, N.; Hashimoto, M.; Ito, H.; Fujii, T.; Murakami, K.; Nakashima, R.; Imura, Y.; Yukawa, N.; Yoshifuji, H.; Taniguchi, A.; Momohara, S.; Yamanaka, H.; Matsuda, F.; Mimori, T. y Terao, C. (2017). Anti-centromere

- antibody exhibits specific distribution levels among anti-nuclear antibodies and may characterize a distinct subset in rheumatoid arthritis. *Scientific Reports*, 7: 6911, 1-8
- Kushwaha, S.; Vikram, A.; Trivedi, P. P. y Jena, G. B. (2011). Alkaline, Endo III and FPG modified comet assay as biomarkers for the detection of oxidative DNA damage in rats with experimentally induced diabetes. *Mutation Research*, 726, 242-250.
- Lacadena, J. R. (1996). *Citogenética*. Madrid, España: Editorial Complutense. 931 pág.
- Lavaut Sánchez, K.; Hernández Aguilar, N. y Ruiz Moleón, V. (2016). Hibridación *in situ* fluorescente: herramienta en el diagnóstico de las hemopatías malignas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 32, 99-109.
- Lloyd, M. y Kidd, D. (2012). The mouse lymphoma assay. En J. Parry y E. Parry, *Genetic Toxicology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (pp. 35-54). New York: Springer.
- Manshian, B. B.; Singh, N. y Doak, S. H. (2013). The *in vitro* micronucleus assay and kinetochore staining: Methodology and criteria for the accurate assessment of genotoxicity and cytotoxicity. En A. B. Dhawan, *Genotoxicity Assessment. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (pp. 269-289). Totowa: Humana Press.
- Martínez-Paz, P.; Morales, M.; Martínez-Guitarte, J. L. y Morcillo, G. (2013). Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. *Mutation Research*, 758, 41-47.
- Miller, B. M. y Adler, I. D. (1990). Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*. *Mutagenesis*, 5, 411-415.
- Mitelman, F. (1995). *ISCN 1995: An international system for human cytogenetic nomenclature (1995): Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*. Memphis, Tennessee, USA: Karger Medical and Scientific Publishers.
- Mohamed, S.; Sabita, U.; Rajendra, S. V. y Raman, D. (2017). Genotoxicity: Mechanisms, testing guidelines and methods. *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science*, 1, 1-6.
- Molinari, G.; Kujawski, M.; Scuto, A.; Soloneski, S. y Larramendy, M. (2012). DNA damage kinetics and apoptosis in ivermectin-treated Chinese hamster ovary cells. *Journal of Applied Toxicology*, 33, 1260-1267.
- Molinari, G.; Soloneski, S.; Reigosa, M. A. y Larramendy, M. (2010). Genotoxic and cytotoxic *in vitro* evaluation of ivermectin and its formulation ivomec® on *Aedes albopictus* larvae (CCL-126™) cells. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 92, 1577-1593.
- Mondal, M. y Guo, J. (2017). Comet-FISH for ultrasensitive strand-specific detection of DNA damage in single cells. *Methods in Enzymology*, 591, 83-95.
- Moroi, Y.; Peebles, C.; Fritzler, M. J.; Steigerwald, J. y Tan, E. M. (1980). Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 1627-1631.
- Mortelmans, K. y Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 20, 29-60.
- Mudry, M. D. y Carballo, M. A. (2006). *Genética Toxicológica*. Buenos Aires, Argentina: Editorial De los Cuatro Vientos. 672 pág.

- Mustafa, S. A.; Karieb, S. S.; Davies, S. J. y Jha, A. N. (2015). Assessment of oxidative damage to DNA, transcriptional expression of key genes, lipid peroxidation and histopathological changes in carp *Cyprinus carpio* L. following exposure to chronic hypoxic and subsequent recovery in normoxic conditions. *Mutagenesis*, 30, 107-116.
- Natale, G.; Vera-Candioti, J.; Ruiz de Arcaute, C.; Soloneski, S.; Larramendy, M. y Ronco, A. E. (2018). Lethal and sublethal effects of the pirimicarb-based formulation Aficida® on *Boana pulchella* (Dumeril and Bibron, 1841) tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 471-479.
- Nath, J. y Johnson, K. L. (2000). A review of fluorescence *in situ* hybridization (FISH): Current status and future prospects. *Biotechnic & Histochemistry*, 75, 54-78.
- Nikoloff, N.; Escobar, L.; Soloneski, S. y Larramendy, M. (2013). Comparative study of cytotoxic and genotoxic effects induced by herbicide S-metolachlor and its commercial formulation Twin Pack Gold® in human hepatoma (HepG2) cells. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 777-781.
- Nikoloff, N.; Larramendy, M. y Soloneski, S. (2014). Assessment of DNA damage, cytotoxicity, and apoptosis in human hepatoma (HepG2) cells after flurochloridone herbicide exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 65, 233-241.
- Nikoloff, N.; Larramendy, M. L. y Soloneski, S. (2014). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus and comet assay for evaluation of fluorochloridone-induced genotoxicity. *Environmental Toxicology*, 29, 884-892.
- Nikoloff, N.; Natale, G. S.; Marino, D.; Soloneski, S. y Larramendy, M. (2014). Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100, 275-281.
- OECD (1997). OECD Guideline 476 for the testing of chemicals. 1-10.
- Olive, D.; Flamm, W. G.; Machesko, M. R. y Bernheim, N. J. (1972). A mutational assay system using the thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. *Mutation Research*, 16, 77-87.
- Olivero, O. A. (2008). Relevance of experimental models for investigation of genotoxicity induced by antiretroviral therapy during human pregnancy. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 658, 184-190.
- Ostling, O. y Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291-298.
- Pérez-Iglesias, J. M.; Ruiz de Arcaute, C.; Natale, G. S., S E y Larramendy, M. L. (2017). Evaluation of imazethapyr-induced DNA oxidative damage by alkaline Endo III- and Fpg-modified single-cell gel electrophoresis assay in *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, 503-508.
- Pérez-Iglesias, J. M.; Ruiz de Arcaute, C.; Nikoloff, N.; Dury, L.; Soloneski, S.; Natale, G. S. y Larramendy, M. L. (2014). The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, 120-126.

- Pérez-Iglesias, J. M.; Soloneski, S.; Nikoloff, N.; Natale, S. y Larramendy, M. L. (2015). Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119, 15-24.
- Perthes, G. (1904). Versuche über den Einfluß der Röntgenstrahlen und Radiumstrahlen auf die Zellteilung. *Deut Med Wochenschr*, 30, 632-634.
- Pillco, A. y de la Peña, E. (2014). Ames test (bacterial reverse mutation test): Why, when, and how to use. En L. M. Sierra y I. Gaivão, *Genotoxicity and DNA Repair* (pp. 3-23). New York: Springer.
- Pitarque, M.; Vaglenov, A.; Nosko, M.; Hirvonen, A.; Norppa, H.; Creus, A. y Marcos, R. (1999). Evaluation of DNA damage by the comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutation Research*, 441, 115-127.
- Repetto Jiménez, M. y Repetto Kuhn, G. (2009). *Toxicología Fundamental*. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos. 675 pág.
- Ruiz de Arcaute, C.; Larramendy, M. L. y Soloneski, S. (2018). Genotoxicity by long-term exposure to the auxinic herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and dicamba on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces:Poeciliidae). *Environmental Pollution*, 243, 670-678.
- Ruiz de Arcaute, C.; Ossana, N. A.; Pérez-Iglesias, J. M.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2019). Auxinic herbicides induce oxidative stress on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 20485-20498.
- Ruiz de Arcaute, C.; Pérez-Iglesias, J. M.; Nikoloff, N.; Natale, G. S.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2014). Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecological Indicators*, 45, 632-639.
- Ruiz de Arcaute, C.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2016). Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128, 222-229.
- Ruiz de Arcaute, C.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2014). Evaluation of the genotoxicity of a herbicide formulation containing 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) in circulating blood cells of the tropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Mutation Research*, 773, 1-8.
- Seriani, R.; Abessa, D. M. S.; Kirschbaum, A. A.; Pereira, C. D. S.; Ranzani-Paiva, M. J. T.; Assunção, A.; Silveira, F. L.; Romano, P. y Mucci, J. L. N. (2012). Water toxicity and cyto-genotoxicity biomarkers in the fish *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 7, 67-72.
- Shimizu, N.; Itoh, N.; Utiyama, H. y Wahl, G. M. (1998). Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *Journal of Cell Biology*, 140, 1307-1320.
- Singh, N. P. (1996). Microgel electrophoresis of DNA from individual cells: principles and methodology. En G. P. Pfeifer, *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations* (pp. 3-24). New York: Plenum Press.

- Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R. y Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.
- Soloneski, S.; González, M.; Piaggio, E.; Reigosa, M. A. y Larramendy, M. L. (2002). Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, Azzurro. III. Genotoxic evaluation on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutation Research*, 514, 201-212.
- Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2017). The use of the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Poeciliidae) in the genotoxic evaluation of environmental pollutants. En M. L. Larramendy, *Ecotoxicology and genotoxicology - Non-traditional Aquatic Models* (pp. 327-346). London: The Royal Society of Chemistry.
- Soloneski, S.; Reigosa, M. A. y Larramendy, M. L. (2002). Effects of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, Azzurro. II. Micronucleus induction in immunophenotyped human lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40, 57-62.
- Soloneski, S.; Reigosa, M. A.; Molinari, G.; González, N. V. y Larramendy, M. L. (2008). Genotoxic and cytotoxic effects of carbofuran and Furadan® on Chinese hamster ovary (CHO_{K1}) cells. *Mutation Research*, 656, 68-73.
- Soloneski, S.; Ruiz de Arcaute, C. y Larramendy, M. L. (2016). Genotoxic effect of a binary mixture of dicamba- and glyphosate-based commercial herbicide formulations on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura, Bufonidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 17811-17821.
- Soloneski, S.; Ruiz de Arcaute, C.; Nikoloff, N. y Larramendy, M. L. (2017). Genotoxicity of the herbicide imazethapyr in mammalian cells by oxidative DNA damage evaluation using the Endo III and FPG alkaline comet assays. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 10292-10300.
- Sorensen, K. C.; Stucki, J. W.; Wagner, E. D.; Wagner, E. D. y Plewa, M. J. (2005). Modulation of the genotoxicity of pesticides reacted with redox-modified smectite clay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46, 174-181.
- Strunjak-Perovic, I.; Coz-Rakovac, R.; Topic Popovic, N. y Jadan, M. (2009). Seasonality of nuclear abnormalities in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) erythrocytes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35, 287-291.
- Tice, R. R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J. C. y Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.
- Vera-Candioti, J.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2010). Genotoxic and cytotoxic effects of the formulated insecticide Aficida® on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces: Poeciliidae). *Mutation Research*, 703, 180-186.
- Vera-Candioti, J.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2013). Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of glyphosate-based herbicides in the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 89, 166-173.

- Vera-Candioti, J.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2013). Pirimicarb-based formulation-induced genotoxicity and cytotoxicity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces: Poeciliidae). *Toxicology and Industrial Health*, 11, 1051-1060.
- Vera-Candioti, J.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2013). Single-cell gel electrophoresis assay in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), as bioassay for agrochemical-induced genotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 368-373.
- Vera-Candioti, J.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2014). Chlorpyrifos-based insecticides induced genotoxic and cytotoxic effects in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Environmental Toxicology*, 29, 1390-1398.
- Walia, G. K.; Handa, D.; Kaur, H. y Kalotra, R. (2013). Erythrocyte abnormalities in a freshwater fish, *Labeo rohita* exposed to tannery industry effluent. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3, 287-295.
- Watson y Crick (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171, 737-738.
- Zalacain, M.; Sierrasesúмага, L. y Patiño, A. (2005). The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28, 227-236.

CAPÍTULO 8

Disrupción endocrina

Fabiana L. Lo Nostro y Gustavo M. Somoza

El ser humano utiliza los recursos disponibles, tanto los naturales como los productos de síntesis, con el objeto de mejorar su bienestar y sus condiciones de vida. Sin embargo, a pesar de que esto ha redundado en su beneficio, el uso no sustentable de los recursos naturales y el posterior descarte de los desechos han afectado la calidad del ambiente en el que se desarrollan las actividades humanas. De esta forma, prevenir y mitigar el impacto de las acciones antropogénicas sobre el ambiente es uno de los desafíos a enfrentar en los próximos años.

El ambiente acuático es el mayor receptor de sustancias de origen antrópico que llegan desde distintas fuentes tales como desagües fabriles, residuos hospitalarios, domiciliarios, etc. Si prestamos atención, por ejemplo, a las plantas de tratamiento de los efluentes cloacales, se vierten en los distintos cuerpos de agua no sólo metabolitos y productos de excreción fisiológicos, sino también los productos del metabolismo de los fármacos que consumimos, productos cosméticos y aquellos relacionados con el cuidado personal, productos de limpieza, plaguicidas, etc. A pesar de que en muchas plantas de tratamiento municipales existen sistemas de tratamiento para estos residuos, no están diseñadas para tratar tal diversidad de agentes químicos, de manera que llegan a los sistemas acuáticos próximos a los asentamientos humanos. Paradójicamente luego utilizamos estos sistemas acuáticos como fuente de agua de bebida.

Algunas de las sustancias vertidas al ambiente tienen efectos biológicos sobre los organismos expuestos y es así como, en los últimos años, se ha puesto especial atención sobre un tipo de sustancias denominadas desorganizadores o disruptores endócrinos (de sus siglas en inglés E.D.C., *Endocrine Disrupting Chemicals*). Estas sustancias son capaces de actuar sobre el sistema endócrino de diferentes maneras. Como agonistas/antagonistas de distintas hormonas, alterando la síntesis y/o el metabolismo de neuropéptidos, neurotransmisores, y/o neurohormonas. El efecto de tal interacción modifica la fisiología endócrina normal y/o el comportamiento, afectando consiguientemente la capacidad de los organismos de reproducirse, desarrollarse, crecer, o simplemente mantener la homeostasis. Antes de mencionar algunos casos emblemáticos relacionados con la presencia de EDCs en el ambiente debemos definir el sistema endócrino, las hormonas y sus receptores.

El sistema endócrino está conformado por un conjunto de órganos que producen y secretan a circulación general sustancias denominadas hormonas, que actúan sobre receptores específicos localizados en las células que conforman los órganos denominados “blanco”, en donde ejercen su acción. En vertebrados, por ejemplo, el sistema de regulación hormonal está formado por

diversas glándulas como la tiroides, la adrenal (o interrenal en peces) y las gónadas, que se encuentran bajo el control directo de una glándula orquestadora de este sistema, denominada hipófisis que, a su vez, se encuentra bajo control cerebral y específicamente hipotalámico. Por otra parte, esos sistemas cerebro-hipófisis-órganos blanco se encuentran a su vez regulados por sistemas de retroalimentación (Figura 8.1.).

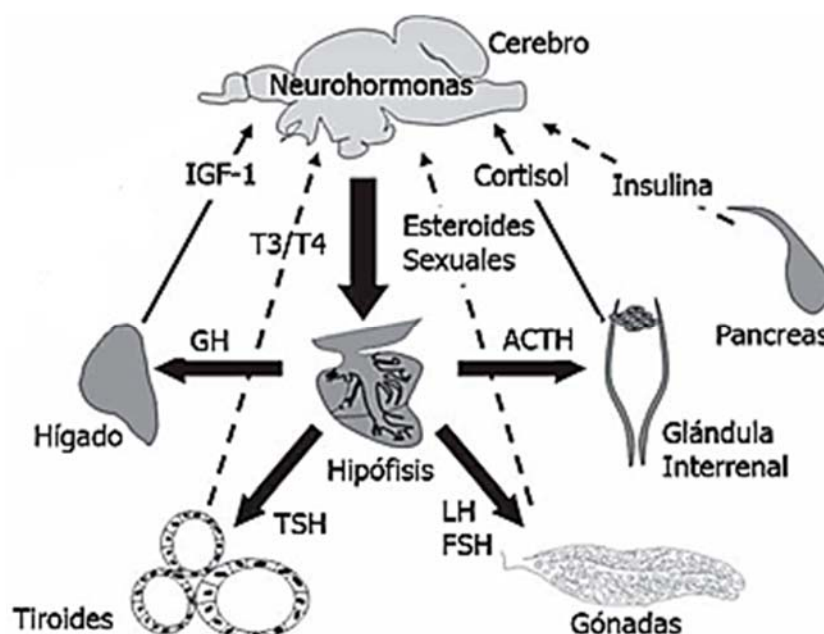


Figura 8.1: Relaciones entre el cerebro y el sistema endócrino en peces. Mediante la liberación de neurohormonas el hipotálamo regula la síntesis y liberación de las hormonas hipofisarias, que a su vez estimulan la secreción de hormonas en órganos periféricos. Estas últimas ejercen una retroalimentación sobre el complejo hipotálamo-hipófisis y regulan la actividad de los sistemas neuroendocrinos. ACTH, hormona adrenocorticotrofa; FSH, hormona folículo estimulante; GH, hormona de crecimiento; IGF-I, factor de crecimiento insulínico tipo 1; LH, hormona luteinizante; T3/T4, hormona tiroidea; TSH, hormona estimulante de la tiroides (Modificado de Kah, 2009).

Sin embargo, hay que tener en consideración que los sistemas de regulación endócrina no son exclusivos de vertebrados, ya que sistemas similares han sido descriptos en invertebrados y también regulan aspectos de la fisiología normal de estos organismos. Dentro de estos procesos, uno de los mejor descriptos y más conocido es el caso de la ecdisona de insectos que es fundamental en los procesos de crecimiento, muda y metamorfosis.

Los EDCs pueden actuar alterando distintos mecanismos regulatorios y, dependiendo del proceso al que nos refiramos, pueden actuar en distintas etapas del ciclo de vida de los organismos. Más aun, como afectan los sistemas hormonales, los EDCs pueden actuar a muy bajas concentraciones y sus efectos pueden manifestarse en otro estadio de vida distinto al del momento de la exposición. De esta forma pueden definirse estadios sensibles y refractarios a sus efectos. Por ejemplo, es sabido que, en peces, el esteroide gonadal estradiol (E_2) está relacionado con la morfogénesis (formación) de los ovarios. Uno de los EDCs con presencia ubicua en los cuerpos de agua de todo el mundo es el 17α -etinilestradiol (EE_2), principio activo de las pastillas anticonceptivas que posee mayor actividad biológica que el E_2 . De esta forma, si una larva de pez se

expone accidentalmente a aguas conteniendo concentraciones biológicamente activas de EE₂, va a sufrir alteraciones en la formación de los ovarios que van a ser visualizadas en el estadio adulto y que pueden llevar a la alteración de esa gónada o directamente a la feminización de todos los individuos expuestos. Tan importante pueden llegar a ser estos efectos que, un estudio de campo realizado en un área de lagos experimentales de Canadá demostró que la exposición crónica a EE₂, en concentraciones ambientalmente relevantes (o sea, aquellas concentraciones que pueden ser halladas en distintos cuerpos de agua) puede conducir al colapso de una población completa de peces, alterando la biodiversidad.

Es claro que el anterior es sólo un ejemplo, y que hoy en día miles de sustancias de uso masivo se producen comercialmente. Entre ellas se encuentra una gran variedad de productos destinados no sólo a la salud humana sino también a la salud animal. Muchas de estas sustancias se consideran contaminantes de “interés o preocupación” emergente/reciente ya que se ha descubierto, o se sospecha, que están presentes y son persistentes en diversos compartimentos del ambiente, y su toxicidad altera el metabolismo de los organismos que habitan en la zona. Esta lista de contaminantes de preocupación emergente es cada vez más amplia e incluye productos tan variados como: tensioactivos, retardantes de llama, plastificantes, productos para higiene personal, parafinas, toxinas de algas, aditivos, hidrocarburos, biocidas, plaguicidas, nanopartículas, además de los mencionados productos farmacéuticos para uso humano o veterinario etc. Estos “nuevos” contaminantes representan un cambio en el pensamiento tradicional, ya que son producidos industrialmente, se dispersan en el ambiente por su excesivo uso a nivel doméstico, comercial e industrial. Muchas de estas sustancias han sido caracterizadas además como EDCs.

Se ha comprobado que varias de estas sustancias son altamente persistentes en el ambiente y algunas tienen la característica de ser pseudo-persistentes (a pesar de ser metabolizadas en el ambiente son constantemente vertidas al mismo, de manera que sus concentraciones se mantienen aproximadamente constantes). Por otro lado, el hecho de que varias publicaciones han remarcado la escasa eficiencia en la remoción por parte de las plantas de tratamiento de efluentes y que el nivel de consumo de medicamentos en las últimas décadas ha ido en constante aumento, los efectos ambientales de estos productos son objeto de preocupación y más aun con el hecho de haber detectado muchos de ellos en el agua potable.

Debido a que muchos de estos productos han sido diseñados con el objeto de alterar distintas funciones fisiológicas en humanos, y a la semejanza de los sistemas de regulación endócrino en animales, no resulta sorprendente que también tengan efectos en los organismos acuáticos. De esta forma, los fármacos que llegan al ambiente tienen la capacidad de actuar como desorganizadores endocrinos afectando las funciones de distintas glándulas endócrinas, ya sea por acción directa o interfiriendo en alguna de las vías metabólicas.

Además del mencionado efecto del EE₂ sobre el colapso de una población de peces en un lago canadiense, se han visto también efectos de otros EDCs sobre distintas poblaciones animales que pueden tomarse como ejemplos paradigmáticos. Por ejemplo, el efecto del derrame de dos plaguicidas, Dicofol y DDT, en el Lago Apopka (USA) sobre la disminución de la capacidad reproductiva del caimán norteamericano, *Alligator mississippiensis*, y los efectos de la exposición

de truchas arco iris, aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes cloacales en el Reino Unido. El denominador común de todos estos casos es la exposición a distintos agentes con efectos estrogénicos (xenoestrógenos) que provocan o bien alteraciones en el proceso de diferenciación sexual o bien alteraciones reproductivas en adultos.

¿Pero es este conflicto privativo de países desarrollados? Una visión superficial podría sugerir eso, sin embargo, hoy en día se ven ejemplos similares en países en vías de desarrollo, y la República Argentina no está exenta a esta problemática. A pesar de que durante los años '90, una serie importante de estudios asociaron la contaminación ambiental con la desorganización endocrina en países desarrollados, recién entre los años 2013 y 2015 se visibilizó este problema en nuestro país cuando se detectó la presencia de varios fármacos en aguas residuales municipales que descargan en los cuerpos de agua dulce o estuarios de zonas con diferentes grados de urbanización.

Como ejemplo, hoy sabemos que los efluentes cloacales vertidos, luego de su tratamiento en la planta de residuos cloacales de la Municipalidad de Chascomús (Provincia de Buenos Aires), presentan tanto esteroides gonadales de origen antrópico (E_2 , testosterona y progesterona) así como compuestos farmacéuticos de uso humano (EE_2), que también pueden detectarse aguas arriba como abajo del efluente, lo que podría afectar la biota acuática local. Es importante remarcar que una fracción importante de los fármacos ingeridos se elimina a través de la orina y de las heces, y, de esta manera ingresa en forma continua en las aguas residuales. Este no es un problema privativo de la Laguna de Chascomús, sino que también se han detectado estas y otras sustancias en el Río Suquía de la provincia de Córdoba. Seguramente, a medida que se realice este tipo de estudios en otros cuerpos de agua en el país se detectarán situaciones similares.

La pregunta que surge inmediatamente es ¿Cómo podemos medir estos metabolitos o sus efectos? En principio, la manera teóricamente más simple es medir las concentraciones presentes en los distintos sustratos, por ejemplo, en el agua. Sin embargo, estos sistemas de medición son complejos, precisan de instrumental costoso y se debe además presuponer qué sustancias se intenta detectar para poner a punto dichos sistemas de medición. Es por esto que muchas veces para analizar los efectos se utilizan modelos biológicos denominados “especies centinela o bioindicadoras” u “organismos test” en las que se buscan determinados efectos fisiológicos. Por ejemplo, si estamos cerca de una descarga de efluentes domiciliarios uno podría hipotetizar que podría detectar efectos, en el modelo biológico elegido, inducidos por hormonas esteroideas.

Y existen herramientas prácticas para hacerlo. Por ejemplo, se puede estudiar la relación de sexos (si las poblaciones de peces que se estudian no sufren procesos migratorios ni son hermafroditas naturales), estudiar la relación plasmática entre estrógenos y andrógenos o evaluar las concentraciones plasmáticas de una proteína de origen hepático denominada vitelogenina (Vtg) que ha resultado particularmente sensible a los estrógenos ambientales.

¿Qué es, qué función tiene y cómo se utiliza esta proteína como biomarcador de exposición a estrógenos? En peces, son sintetizadas en el hígado en respuesta al E_2 de origen ovárico, que son incorporadas al oocito y transformadas, dando origen al vitelo, el cual provee los nutrientes necesarios para el desarrollo embrionario en animales ovíparos. El proceso por el cual se produce Vtg (en peces se ha descrito más de una variante) y se incorporan al oocito se denomina

vitelogenesis. Como este proceso es dependiente de E_2 de origen gonadal, la exposición a estrógenos ambientales puede también estimular este proceso (Figura 8.2.). En condiciones normales, esta proteína (en principio exclusiva de los peces hembra), puede ser detectada en peces machos expuestos a ambientes contaminados con xenoestrógenos. Como en los peces macho esta proteína no puede ser exportada ni acumulada en ningún órgano blanco, queda en circulación en el plasma. Además, los peces macho expuestos a ambientes estrogénicos presentan alteraciones en los niveles de andrógenos plasmáticos y anomalías en la histoarquitectura testicular. La presencia de Vtg puede también ser detectada en el mucus superficial que recubre el cuerpo del animal lo que representa una herramienta de evaluación interesante ya que no se debe manipular demasiado al pez, ni sacarle sangre o sacrificarlo.

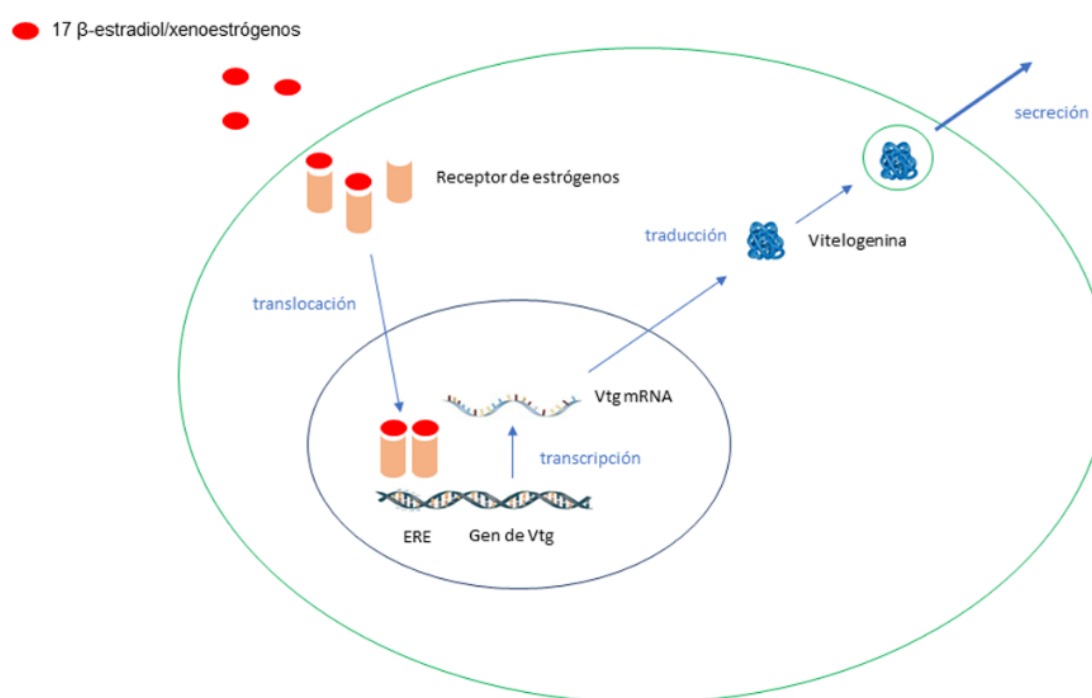


Figura 8.2: Mecanismo molecular de la síntesis de vitelogenina en un hepatocito de pez. El E_2 , o algún xenoestrógeno, se une a los receptores de estrógenos, trasloca al núcleo e inicia el proceso de transcripción y traducción de la vitelogenina que es secretada a circulación general.

Existen también otros métodos para detectar actividad estrogénica en matrices acuosas, como por ejemplo el uso de bioensayos de transactivación *in vitro*. Estos ensayos constan del uso de líneas celulares transfectadas con el receptor de estrógenos que emiten fluorescencia en respuesta a la presencia de estrógenos en la matriz acuosa. A pesar de que estos ensayos son costosos, son extremadamente sensibles y se han utilizado con resultados positivos en análisis de aguas de distintos países desarrollados, así como en aguas continentales de la República Argentina. Los resultados preliminares obtenidos en nuestro país permiten además hipotetizar que es probable que debido a la falta o al tipo de tratamiento de aguas residuales, este problema sea más grave aún que en los países desarrollados.

A pesar de haber enunciado sólo un tipo de conflicto ambiental, como ser el de la presencia de estrógenos en cuerpos de aguas asociadas a poblaciones humanas, podemos pensar qué otro tipo de sustancias de origen antrópico son liberadas y pensar en formas de identificación y del modo de acción.

En resumen, la problemática de la presencia de compuestos desorganizadores endocrinos no es privativa de los países desarrollados y cada vez se publican más datos acerca de este problema en países en vías de desarrollo. Esto puede deberse en parte a que los sistemas de tratamientos de residuos cloacales son ineficientes o bien, en muchos casos directamente inexistentes. También es importante considerar que en nuestro país estos compuestos aún no han sido sometidos a criterios de regulación o normas para la protección de la salud humana ya que la falta de datos impide la correcta evaluación de los riesgos asociados, así como el tratamiento y descarte pertinentes. De esta forma, una evaluación integral, así como más información sobre los efectos en la flora y fauna autóctonas aportaría a la resolución del interrogante y obligaría a los organismos reguladores a reevaluar sus normas y directrices en el sentido de la protección ambiental y de la salud humana.

Bibliografía

- Dorelle L., Da Cuña R., Rey Vázquez G., Höcht C., Shimizu A., Genovese G., Lo Nostro F., 2017. The SSRI fluoxetine exhibits mild effects on the reproductive axis in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Cichliformes). *Chemosphere* 171: 370-378.
- Elorriaga, Y.; Marino, D.J.; Carriquiriborde, P.; Ronco, A.E., 2013. Human pharmaceuticals in wastewaters from urbanized areas of Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 90: 397-400.
- Elorriaga, Y.; Marino, D.J.; Carriquiriborde, P.; Ronco, A.E., 2013. Screening of pharmaceuticals in surface water bodies of the Pampas region of Argentina. *International Journal of Environment and Health* 6: 330-339.
- Genovese, G., Regueira, M.; Da Cuña, R.H.; Ferreira, M.F.; Varela, M.L., Lo Nostro, F.L., 2014. Non-monotonic response of vitellogenin and estrogen receptor α gene expression after octylphenol exposure of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae). *Aquatic Toxicology* 156, 30-40.
- Gilbert, L., 2012. *Insect Endocrinology*. Academic Press. USA.
- González, A.; Kroll, K.J.; Silva-Sanchez, C.; Carriquiriborde, P.; Fernandino, J.I.; Denslow, N.D.; Somoza, G.M., 2020. Steroid hormones and estrogenic activity in the wastewater outfall and receiving waters of the Chascomús chained shallow lakes system (Argentina). *Science of the Total Environment* 743: 140401.
- Guillette Jr, L.J.; Gross, T.S.; Masson, G.R.; Matter, J.M.; Percival, H.F.; Woodward, A.R., 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environmental Health Perspectives* 102: 680-688.

- Hued A., Lo Nostro F., Wunderlin D. and Bistoni M. A., 2013. Reproductive impairment of a viviparous fish species inhabiting a freshwater system with anthropogenic impact. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 64, 2:281-290.
- Kah, O., 2009. Endocrine targets of the hypothalamus and pituitary. En: *Fish Endocrinology*. Bernier, N.J.; Van Der Kraak, G.; Farrell, A.P.; Brauner, C.J. (Eds.). pp. 75-114. Academic Press, USA.
- Kar S., Sangem P., Anusha N., Senthilkumaran B., 2021. Endocrine disruptors in teleosts: Evaluating environmental risks and biomarkers. *Aquaculture and Fisheries* 6, 1, 1-26.
- Kidd, K.A.; Blanchfield, P.J.; Mills, K.H.; Palace, V.P.; Evans, R.E.; Lazorchak, J.M.; Flick, R.W., 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 8897-8901.
- Lacaze, E.; Gauthier, C.; André, C.; Couture, P.; Desrosiers, M.; Cloutier, F.; Gagné, F., 2017. Municipal effluent exposures in fathead minnows during partial life cycle: Endocrine disruptive effects and impact on reproduction. *Current Topics in Toxicology* 13: 31-45.
- Meijide F., Da Cuña R., Pietro J., Dorelle L., Babay P., Lo Nostro F. 2018. Effects of waterborne exposure to the antidepressant fluoxetine on swimming and behavioural responses of the mosquitofish *Gambusia holbrooki*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 163, 646-655.
- Moncaut N., Lo Nostro F. and Maggese M.C., 2003. Vitellogenin detection in surface mucus of the southamerican cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17 β . Effects on liver and gonads. *Aquatic Toxicology* 63, 127-137. ISSN 0166-445x.
- Rojo M., Álvarez-Muñoz D., Dománico A., Foti R., Rodríguez-Mozaz S., Barceló D., et al., 2019. Human pharmaceuticals in three major fish species from the Uruguay River (South America) with different feeding habits. *Environ. Pollut.*; 252: 146-154.
- Rehman, M.S.U.; Rashid, N.; Ashfaq, M.; Saif, A.; Ahmad, N.; Han, J.I., 2015. Global risk of pharmaceutical contamination from highly populated developing countries. *Chemosphere* 138: 1045-1055.
- Sauvé, S., Desrosiers, M., 2014. A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal* 8, 15.
- Sullivan, C.; Yilmaz, O., 2018. Vitellogenesis and Yolk Proteins, Fish. *Encyclopedia of Reproduction*. Skinner. M.K. (Ed.) 6: 266-277.
- Valdés, M.E.; Amé, M.V.; Bistoni, M.A.; Wunderlin, D.A., 2014. Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquia River basin (Córdoba, Argentina). *Science of The Total Environment* 472: 389-396.
- Valdés, M.E.; Marino, D.J.; Wunderlin, D.A.; Somoza, G.M.; Ronco, A.E.; Carriquiriborde, P., 2015. Screening concentration of E1, E2 and EE2 in sewage effluents and surface waters of the "Pampas" region and the "Río de la Plata" estuary (Argentina). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 94: 29-33.
- Waye, A., Trudeau, V.L., 2011. Neuroendocrine disruption: more than hormones are upset. *Journal of Toxicology and Environmental Health B* 14: 270-291.

CAPITULO 9

Efectos de los contaminantes sobre el comportamiento

Bettina Eissa y Natalia Ossana

*Dedicado a Lucrecia Ferrari y Alfredo Salibián
Quienes fueron, son y serán nuestros mentores y guías.*

La conducta es un rasgo biológico resultado del proceso de selección natural. La teoría de Darwin postula que el resultado principal de estos procesos es la adaptación biológica. La selección natural favorece rasgos, como los conductuales, que son útiles en la lucha por la supervivencia y la reproducción. La conducta animal es la resultante de la interacción entre la carga genética, su estructura y fisiología, y las características del ambiente. Todo esto constituye el marco necesario para el desarrollo del comportamiento. Así, la vida de un organismo está estrechamente adaptada a las condiciones físicas y químicas propias de su entorno y también a las bióticas, producto de la interacción con individuos de su misma especie u otras, que integran la comunidad de la cual forma parte. En suma, los animales responden ante eventos y variaciones de diverso carácter que pueden ocurrir en su ambiente. (Peláez del Hierro y Veà Baró, 1997; Dell’Omo, 2002).

La toxicología y el comportamiento

El comportamiento sirve como un nexo entre los procesos fisiológicos y ecológicos, siendo un parámetro ideal para estudiar los efectos adversos de los contaminantes en ambientes naturales o en condiciones de laboratorio (Grue y col., 2002; Gilmour y col., 2005).

Desde la perspectiva toxicológica, el estudio del comportamiento contempla observaciones que pueden ser cuantificadas objetiva y rápidamente. Teóricamente cualquier patrón comportamental de un animal puede servir para un test toxicológico, pero en la práctica, los experimentos son más confiables si se focalizan en un aspecto específico. Esto se debe a que algunos de dichos patrones pueden ser restringidos temporalmente (cortejo y reproducción) y/o difíciles de ser monitoreados en el laboratorio porque se ponen de manifiesto en una etapa definida del ciclo

de vida, en alguna estación particular del año o en algún momento del día (por ejemplo, comportamientos de cortejo que solo se despliegan en un momento particular del día o en una estación climática del año). Por ejemplo, Cazenave y col. (2008) observaron los efectos de la microcistina sobre la actividad y la velocidad de nado en *Jenynsia multidentata*. Esta especie mostró una variación diaria de estos parámetros natatorios que no se vieron modificados por el tóxico.

En los últimos 20 años se ha incrementado el uso de animales acuáticos, tanto vertebrados como invertebrados, como indicadores precoces de la calidad toxicológica del medio acuático. Los peces fueron uno de los primeros en ser utilizados en los protocolos de monitoreo ecotoxicológico acuático y aún siguen siendo de elección como especies centinela en diversos bioensayos de toxicidad (de la Torre y col., 2002, 2005; Scarcia y col., 2014; Ossana y col., 2016).

Los ensayos biológicos o bioensayos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto provocado por algún agente físico, químico o biológico sobre un organismo de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas (Ronco y col., 2004).

Los bioensayos para evaluar parámetros comportamentales con organismos acuáticos se han diseñado considerando:

a. *Comportamientos individuales:*

- Respuestas locomotoras (de tipo preferencia/rechazo) y cambios en la actividad (Drummond y Russom, 1989; Svecevicius, 1999).
- Aprendizaje y retención de comportamientos condicionados.
- Comportamientos de alimentación (Wendelaar Bonga, 1997).
- Selección de ambientes por su perfil fisicoquímico (por ejemplo concentración de oxígeno y temperatura).
- Respuestas ventilatorias (movimientos operculares y bucales).
- Natación: alteración de la velocidad y dirección de nado, pérdida de equilibrio, etc. (Eissa y col. 2009, Meijide y col., 2018).

b. *Comportamientos sociales:*

- Interacciones predador-presa (Weis y Candelmo, 2012).
- Relaciones sociales (agresión, territorialidad, jerarquías) (Bridi y col., 2017).
- Comportamientos reproductivos (cortejo, cuidado parental, desove).
- Señales de alarma (Speedie y Gelai, 2008).

Estos comportamientos también se identifican como respuestas primarias a las que siguen las respuestas secundarias o fisiológicas. En la [Figura 9.1](#) se esquematiza el circuito de eventos que un estímulo ambiental puede desencadenar en un organismo hasta que se generan respuestas comportamentales (primarias) y fisiológicas (secundarias).

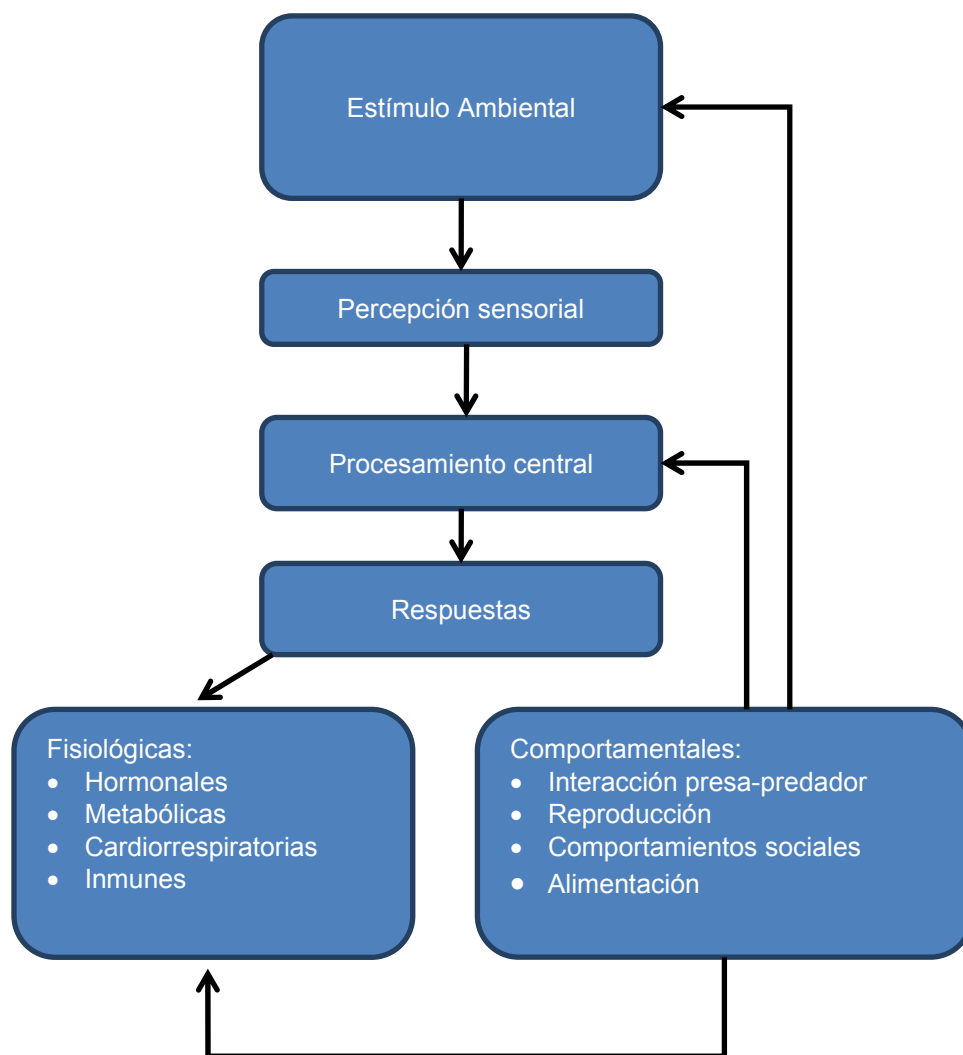


Figura 9.1: Interrelaciones de factores ambientales y fisiológicos y su influencia en la *performance* del comportamiento normal (de Scott y Sloman, 2004).

El comportamiento juega un importante papel en la selección del hábitat, de manera tal que un organismo en un medio contaminado puede encontrarse restringido a una parte del ambiente cuyos parámetros estén dentro del rango de su tolerancia homeostática.

Siendo que el comportamiento está sujeto a la selección natural, se podrían seleccionar los tipos de conductas que favorecerían la adaptación del animal al estrés ambiental.

En el área que nos interesa, se entiende por estrés al estado producido por un factor ambiental que lleva los niveles de las respuestas adaptativas del animal a valores diferentes de los de sus límites homeostáticos de tolerancia, por lo que su probabilidad de sobrevivir se verá reducida (Hugget, 1992).

Dentro de todas las respuestas generadas frente a una situación de estrés, el comportamiento animal juega un rol dual. Por un lado, puede permitir evitar estímulos peligrosos mientras que por el otro, en un contexto ecotoxicológico, es un atributo indicador que pone en evidencia el grado de estrés ambiental en el que se encuentra el animal (Beitinger, 1990).

Cuando los contaminantes alcanzan hábitats acuáticos afectan a la biota de esos ambientes en grado variable (según su sensibilidad, edad, sexo, estado nutricional, etc.), pudiendo desencadenar algunas alteraciones conductuales inmediatas, a las que se considera biomarcadores. El término biomarcador o marcador biológico, usado en un sentido amplio, es un cambio observable o medible de carácter variable a nivel molecular, bioquímico, celular, fisiológico o comportamental que revela la exposición, presente o pasada, de un organismo en un medio en el que se halla una sustancia química de carácter contaminante (Lagadic y col., 1997).

Entre los diferentes tipos de biomarcadores, los comportamentales constituyen un grupo de indicadores que concita el interés creciente en estudios de Ecotoxicología Acuática. Las alteraciones comportamentales de los individuos afectados pueden constituirse en biomarcadores de efecto. Estas respuestas pueden repercutir en niveles superiores de organización como los de población y/o comunidad (Fleeger y col., 2003).

A continuación, se describen algunos parámetros etológicos utilizados en estudios ecotoxicológicos orientados al estudio de diferentes aspectos de la problemática ambiental asociada a los efectos adversos de los contaminantes que pueden hallarse en los medios acuáticos.

Técnicas de evaluación

Aclimatación

La aclimatación se define como los cambios que ocurren en el estado fisiológico debido a ajustes a largo plazo frente a ambientes que difieren en uno o dos parámetros como por ejemplo la temperatura (Hill y col., 2016).

La importancia del tiempo de aclimatación adecuado se ha descrito en las pautas estándar para pruebas de toxicidad (ASTM, 2014; IRAM 29112/2008), y se ha enfatizado la relevancia específica para la investigación del comportamiento con peces (Kane y col., 2005; Melvin y col., 2017).

Velocidad de nado crítica

La velocidad de nado crítica (U_{crit}) es una medida estándar para evaluar las capacidades de natación de los peces. Para realizar esta medición, se introduce un pez en un túnel de agua en el que el investigador puede controlar la velocidad de la corriente. La medida se inicia a baja velocidad del agua que luego se incrementa gradualmente a intervalos prescritos. Los peces tienden a mantener su posición en el túnel de agua contra la corriente hasta que se acumula la fatiga. El tiempo y la velocidad en la que se observa la fatiga de los peces se utiliza para calcular la velocidad crítica de la natación. Esta metodología es ampliamente utilizada para evaluar los efectos de los contaminantes en la performance de nado de los peces (Kolok y col., 1998).

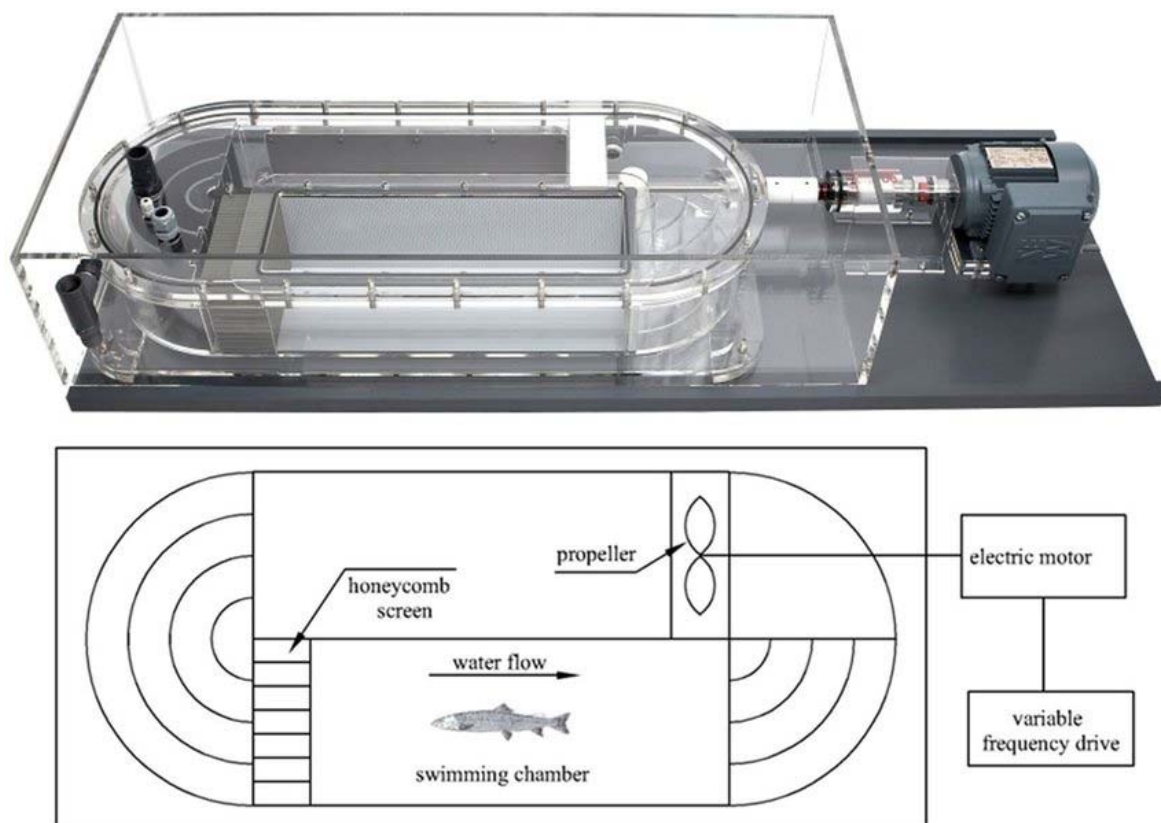


Figura 9.2: Fotografía y diagrama esquemático del respirómetro de túnel de natación (LoligoSystems SW10200, Dinamarca).

La velocidad de nado crítica se calcula según la fórmula:

$$U_{crit} = U_i + (T_i/T_{ii} \times U_{ii})$$

Donde, U_{crit} : velocidad de nado crítica (cm/s); U_i : mayor velocidad mantenida por 5 minutos; T_i : tiempo de fatiga en la última velocidad de corriente (min); T_{ii} : intervalo de U_i (5 min); U_{ii} : incremento en la velocidad (5 cm/s).

Índice de actividad relativa

Algunos autores como Kolok (1999) y Grillitsch y col. (1999) demostraron que las variaciones individuales asociadas a la performance de nado, son importantes e inevitables. Ellos concluyeron que el análisis de los datos experimentales se debe realizar utilizando una aproximación individual, evaluando los parámetros conductuales de cada animal, antes y durante la exposición al tóxico. Por este motivo Eissa (2009) diseñó un método de cálculo que permitió estandarizar los resultados en forma numérica mediante un Índice de Actividad Relativa (I_a). A través de este Índice se pudo evaluar y expresar cuantitativamente la actividad natatoria total de los peces, y detectar comparativamente variaciones de la misma en diferentes períodos, condiciones y períodos experimentales.

Actividad natatoria total expresada como el Índice de Actividad Relativa (**la**). El mismo se calculó de la siguiente forma:

$$la = \frac{\text{promedio de los movimientos totales del período experimental}}{\text{movimientos totales del día } i}$$

donde, i = día de la experimentación

Cuando $la = 1$ no se produjeron cambios en la actividad natatoria total, mientras que un $la > 1$ indica que ocurrió una disminución en la actividad natatoria; lo contrario corresponde cuando $la < 1$.

Preferencias espaciales

Otra metodología utilizada en la evaluación comportamental es la evaluación del uso del espacio de los peces. Para tal fin se pueden sectorizar los acuarios y registrar preferencias espaciales o conductas de escape del sitio de goteo del tóxico. Esta evaluación puede realizarse a partir de filmaciones y el posterior análisis mediante el uso de algún software (Animaze, LollyTrack, etc.) o por observación directa de las imágenes. En la [Figura 9.3](#), se esquematiza un modelo de pecera para evaluar la distribución de los peces en ensayos de toxicidad.

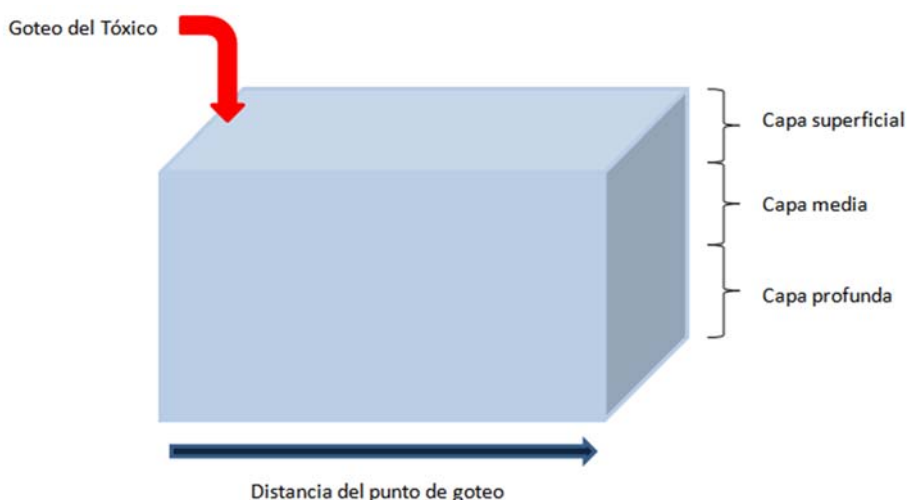


Figura 9.3: Esquema de una pecera sectorizada.

- c.1) Preferencia Altitudinal evaluada como frecuencia de veces (en %) que el animal fue registrado en cada una de las franjas horizontales en los acuarios (Capa superficial, media o profunda) o número de peces en cada franja en determinados períodos de tiempo (cada 1 o 5 minutos, por ejemplo). Dipp y col. (2018) evaluaron dos indicadores de ansiedad en peces: el tiempo de permanencia en la capa superior y el tiempo requerido por los peces para acceder a dicha capa.

- c.2) Preferencia Lateral evaluada como frecuencia de las veces (en %) en que un pez fue registrado en cada una de las franjas verticales en los acuarios o número de peces en cada franja en determinados períodos de tiempo (cada 1 o 5 minutos, por ejemplo) o distancia del punto de goteo.

Distancias de recorrido y Velocidad media de natación

La natación de los peces incluye un conjunto de parámetros que pueden ser afectados por la exposición a una diversidad de contaminantes. Las alteraciones en la natación pueden evaluarse cualitativamente y cuantitativamente. El estudio de la velocidad de nado es una de las medidas más sensibles para detectar la contaminación.

La metodología utilizada para evaluar estos parámetros en general consiste en filmaciones de corta duración (6-10 minutos) que luego son evaluadas con programas específicos tales como ANY-Maze, LolyTrack o Ethovision, muchos de ellos se encuentran disponibles de modo gratuito.

Evaluación de conductas sociales

Estas evaluaciones se realizan a partir de filmaciones cuya duración dependerá de los objetivos específicos del investigador. Generalmente la extensión en el tiempo oscila entre 15 y 60 minutos. Son muchos los parámetros que pueden estudiarse a partir de las filmaciones: interacciones predador-presa, respuesta a señales de alarma, conductas sexuales (cópulas o intentos de cópula), conductas agresivas (persecuciones, mordidas, coletazos), territorialidad, establecimiento de jerarquías, comportamientos alimentarios, etc.

Las metodologías utilizadas para evaluar las filmaciones se agrupan dentro de dos grandes categorías (Fonio y col., 2012):

1. Muestreo focal: el observador mantiene la atención centrada únicamente en el comportamiento de un individuo a lo largo de toda la sesión. En cada sesión se focalizan diferentes individuos a fin de recoger información de todo el grupo.
2. Muestreo multifocal o de barrido: el observador focaliza a cada uno de los sujetos del grupo por turnos y durante cortos intervalos de tiempo. Por ejemplo, se cuenta cuántos individuos del grupo se están alimentando o se encuentran en la superficie del acuario.

En la [Tabla 9.1](#) se describen algunos comportamientos agresivos usualmente utilizados en estudios toxicológicos:

Tabla 9.1. Conductas agresivas (Adaptado de Colman y col., 2009)

Comportamientos agresivos	Descripción
Mordidas	Acción de morder del pez dominante al final de una persecución.
Persecuciones	Los peces dominantes se dirigen hacia los peces subordinados y, a menudo, los muerden al final del intervalo de persecución.
Giros	Los peces se alinean de cabeza a cola frente a las direcciones opuestas. Ambos nadando hacia adelante formando un círculo.
Evasión	Los peces subordinados permanecen muy quietos, y en contacto con el fondo del acuario para evitar ser perseguidos o mordidos por los peces dominantes.

Alteraciones en el nado

Drummond y Russom (1989) estudiaron sobre *Pimephales prometas* la toxicidad comportamental debido a la exposición a un gran número de xenobióticos, clasificando los síntomas de alteración en el nado en tres clases de síndromes:

1. de hipoactividad: se reduce la actividad locomotora espontánea y la respuesta frente a un estímulo externo es pequeña o inexistente, batido opercular rápido y corto;
2. de hiperactividad: la actividad aumenta y se aprecia un aumento en la respuesta frente a un estímulo, el batido opercular es amplio;
3. de deformidad física: la actividad está usualmente deprimida, existe una sobre reactividad frente a un estímulo; se observan además espasmos, convulsiones, escoliosis/lordosis y hemorragia.

Algunos resultados obtenidos en la evaluación de parámetros comportamentales para evaluar toxicidad

Hace aproximadamente 20 años en el Laboratorio del Programa de Ecofisiología (PRODEA-Universidad Nacional de Luján) iniciamos el estudio de los efectos de algunos contaminantes sobre el comportamiento de peces. Aquí les presentamos alguno de nuestros resultados:

Efectos de la exposición a Cadmio subletal

El Cadmio (Cd) se utilizó como tóxico de referencia. Se trata de un metal no ferroso que llega al ambiente a partir de la galvanización, producción de baterías de Níquel-Cadmio, fabricación

de estabilizadores de cloruro de polivinilo, pigmentos y esmaltes, celdas fotoeléctricas, cables eléctricos, acumuladores, fusibles, laminados de vapor y soldadura, aleaciones, combustión de diesel y petróleo, fertilizantes fosfatados, pesticidas, desechos de fundiciones y refinamiento de metales no ferrosos (Cobre, Níquel y Zinc) y petróleo (Bandara, 2010).

Se ha demostrado su efecto teratogénico, embriotóxico, carcinogénico, y nefrotóxico en invertebrados, vertebrados e incluso los seres humanos (Luo y col., 1993; Ossana y col., 2009). Este metal puede ser absorbido desde el entorno por las branquias de peces debido a su área extensa en contacto con el medio externo y al reducido espesor de las membranas (Vigliano y col., 2006). Un efecto común de la exposición al Cd en los vertebrados, es la hipocalcemia, la cual es acompañada algunas veces por hipermagnesemia. En los peces ese efecto se atribuye a la inhibición de la captación de Ca^{+2} (WHO, 1992; Sloman y col., 2003; Evans y col., 2005; Ferrari y col., 2009). En la [Tabla 9.2](#) se muestran los resultados obtenidos en la determinación del *Índice de Actividad Relativa* en *Cyprinus carpio* expuestos a Cadmio y sus Controles contemporáneos y luego de su transferencia a medios limpios (R) (recuperación) (Eissa, 2009).

Se registraron diferencias significativas entre el período Control y el de Exposición para *Cyprinus carpio* en las tres concentraciones de Cd. Además, se observaron diferencias entre los períodos Control y Recuperación para 0,30 y 0,60 mg.L^{-1} .

Tabla 9.2. Índice de Actividad Relativa (I_a) de juveniles de *Cyprinus carpio* expuestos a Cd y de individuos que fueron pasados a medios limpios para evaluar recuperación.

Concentración de Cadmio (mg.L^{-1})	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
0,30	1,060 $\pm$ 0,170 (56)	2,850 $\pm$ 1,400 (56)**	1,170 $\pm$ 0,180 (98)**
0,50	0,815 $\pm$ 0,053 (36)	1,550 $\pm$ 0,600 (36)**	1,070 $\pm$ 0,330 (63)
0,60	0,820 $\pm$ 0,080 (16)	1,029 $\pm$ 0,102 (16)**	1,084 $\pm$ 0,316 (28)**

Datos expresados como medias $\pm$ ESM; entre paréntesis, número de determinaciones. **: $p < 0,01$

Efectos de la exposición a Ibuprofeno

El ibuprofeno se encuentra dentro de los antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDS); los mismos inhiben las ciclooxygenasas que catalizan la biosíntesis de prostaglandinas, las cuales están parcialmente involucradas en la génesis del dolor y la inflamación. Esta inhibición es responsable del efecto analgésico y antiinflamatorio (Cleuvers y col., 2004; Salibián, 2014). Entre otras funciones de las prostaglandinas está su habilidad para causar contracciones musculares en diferentes órganos con efectos sobre la presión sanguínea y la circulación.

Efectos sobre la natación

En la [Figura 9.4](#). se muestran los resultados del I_a en ambos periodos experimentales: Control (Día 1 a 4) y Exposición (Día 5 a 18) (Eissa y col., 2014).

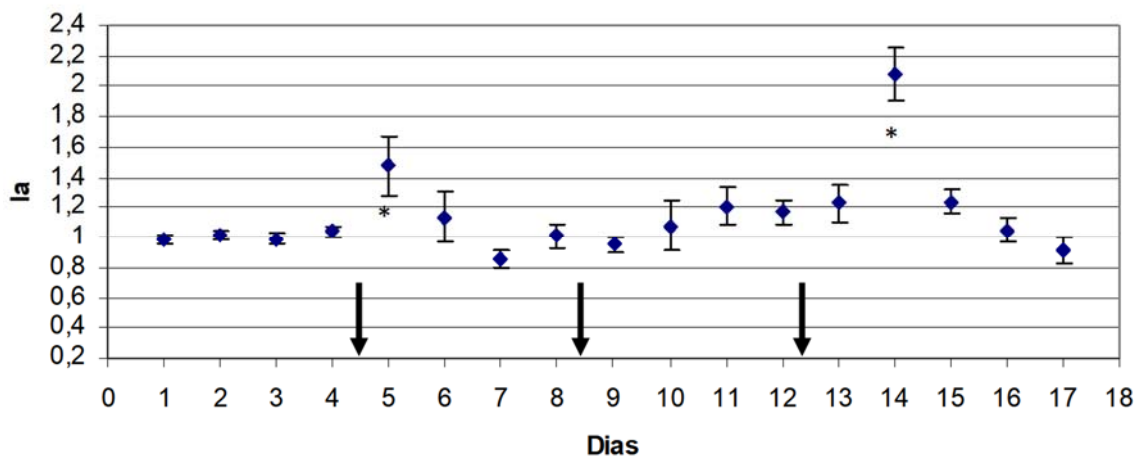


Figura 9.4: Índices de Actividad Relativa (I_a) de los peces Expuestos a $100 \mu\text{g Ibuprofeno.L}^{-1}$. Datos expresados como medias $\pm$ ESM (N= 12). La flecha negra indica el momento en que se realizaba la renovación del medio. *indica diferencia significativa respecto del control ($p < 0.01$)

Cuando se aplicó esta técnica en la evaluación de la toxicidad del Ibuprofeno en medio acuático, observamos que inmediatamente al inicio de la exposición al fármaco (día 5) ocurrió un breve y transitorio aumento significativo del I_a , es decir una disminución de la actividad natatoria de los peces que paulatinamente volvió a sus valores basales, sin embargo, el aumento volvió a repetirse el día 9 y el 14. Es interesante mencionar que los aumentos del Índice fueron coincidentes con los momentos en los cuales se producía la renovación del medio. En ningún caso se registró mortalidad en los peces ensayados.

En la [Tabla 9.3](#). se muestran los resultados de los ensayos de exposición a $100 \mu\text{g/L}$ (concentración nominal) a machos y hembras de con *Cnesterodon decemmaculatus*. Estos resultados se obtuvieron con el software LolyTrack luego de filmaciones individuales de 6 minutos cada una.

Tabla 9.3: Efectos sobre la natación en *C. decemmaculatus* expuestos a ibuprofeno

	Sexo(n)	Longitud [mm]	Velocidad [mm/s]	Aceleración [mm/s ²]	Actividad [s]	Distancia [n° cuerpos]
Ctr	Hembras (16)	21,5 $\pm$ 0,9	19 $\pm$ 2	194 $\pm$ 16	112 $\pm$ 07	110 $\pm$ 15
	Machos (15)	20,6 $\pm$ 0,5	21 $\pm$ 1 ^a	211 $\pm$ 25	110 $\pm$ 10	125 $\pm$ 23
IBU	Hembras (16)	19,5 $\pm$ 1,0	18 $\pm$ 2 ^b	176 $\pm$ 15 ^a	100 $\pm$ 08	104 $\pm$ 19 ^b
	Machos (13)	20,6 $\pm$ 0,4	29 $\pm$ 3 ^{ab}	273 $\pm$ 52 ^a	113 $\pm$ 08	155 $\pm$ 15 ^b

Los parámetros natatorios de las hembras no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, pero si se observó que las que estuvieron expuestas tienden a tener valores entre un 5 y un 10% menores que sus controles. En el caso de los machos las diferencias en la velocidad son significativas desarrollando una velocidad media 50% mayor que la de los machos control (Ferro, 2017).

Efectos sobre conductas sociales

Los comportamientos reproductivos y agresivos son controlados hormonalmente y pueden servir como indicadores sensibles de la exposición subletal a diversos compuestos (Scott y Sloman, 2004).

En los últimos años, la actividad sexual se ha utilizado como un indicador no invasivo y sensible de toxicidad, con alteraciones en el comportamiento reproductivo que incluyen una disminución en la intensidad de la exhibición sexual y en la frecuencia de intentos de cópula y cópulas (Huang y col., 2015; Wang y col., 2014).

En la [Figura 9.5](#) se muestran fotografías correspondientes a algunas alteraciones comportamentales de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a ibuprofeno.



Figura 9.5: Alteraciones observadas en *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a ibuprofeno. a) Episodio de nado alterado; b) Intento de cópula; c) Agresión (coletazo).

En la [Figura 9.6](#) se presentan resultados correspondientes a la evaluación de comportamientos sociales en *Cnesterodon decemmaculatus* luego de una exposición a 50 y 130 $\mu\text{g/L}$ de ibuprofeno. Estos resultados fueron obtenidos por el método de barrido a partir de videos de 15 minutos de duración.

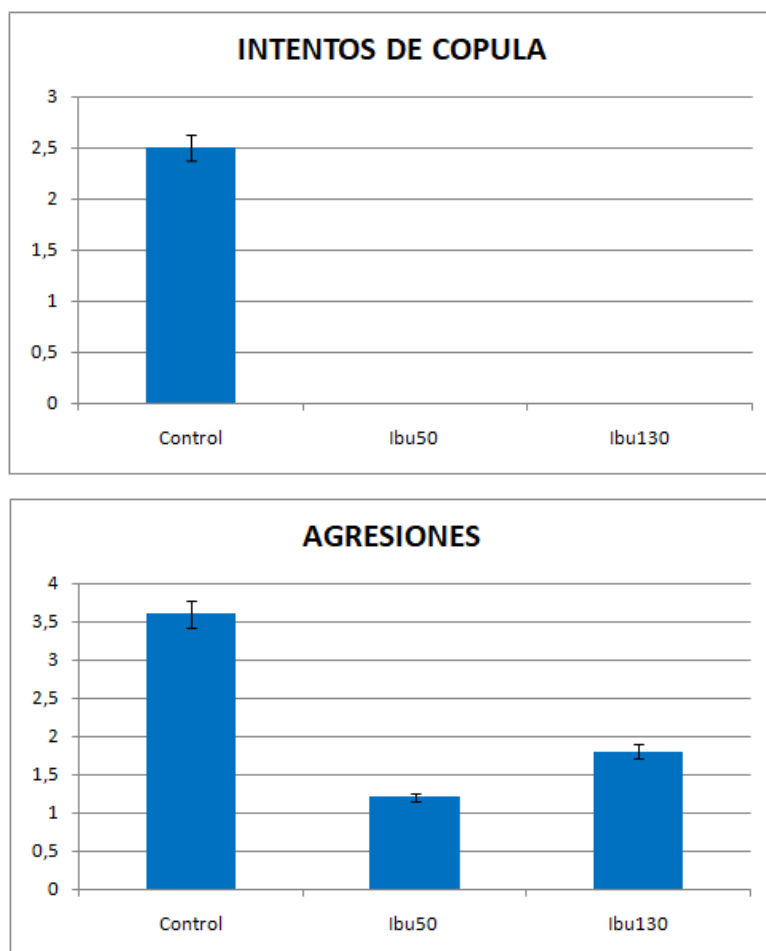


Figura 9.6: a) Número de intentos de cópula (media $\pm$ ESM);
b) Número de agresiones (media $\pm$ ESM) (de Diego y col., 2018)

Para ambos grupos expuestos se observó una reducción parcial de las conductas agresivas y los intentos de cópula. Ambas reducciones fueron estadísticamente significativas.

Otros trabajos realizados en Argentina

En la Argentina hay varios grupos de investigación que están llevando a cabo estudios sobre efectos de contaminantes en el comportamiento de peces:

Universidad de Córdoba:

Bonifacio y col. (2016) de la Universidad de Córdoba utilizaron el programa ANY-Maze® Stoelting Co. Cazenave y col. (2008) estudiaron la actividad natatoria a partir de registros de 10 min cada hora durante 24 hs usando una filmadora conectada a una computadora. Evaluaron la velocidad media y el porcentaje de movimiento de *Jenynsia multidentata* por exposición a microcistina-RR.

Universidad de Buenos Aires

En La Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de esta Universidad se están llevando adelante estudios comportamentales con *Gambusia holbrooki* expuestos a un antidepresivo donde evalúan la actividad natatoria a partir de filmaciones con el software Ethovision XT 12.0 (Meijidey col., 2018).

Llamazares Vegh y col. (2021) investigaron las diferencias en la morfología externa, el estado nutricional y las capacidades de natación de larvas tempranas de *Prochilodus lineatus* alimentadas y no alimentadas en condiciones experimentales.

Discusión final

Los pioneros en el estudio del comportamiento animal argumentaban que para comprenderlo completamente se debería conocer el desarrollo, la causa y la evolución de las conductas. Tradicionalmente la Fisiología y la Biología del Comportamiento se visualizaban como dos campos separados y la literatura se focalizaba en uno u otro. Actualmente, ambas disciplinas se han integrado relacionando estudios empíricos de laboratorio con observaciones de campo (Grue y col., 2002).

Los estudios comportamentales integran procesos bioquímicos, celulares y neuronales y sirven como enlace a las respuestas fisiológicas frente a los procesos ecológicos. Los biomarcadores comportamentales son una herramienta útil para evaluar de manera temprana los efectos de la contaminación y su implementación en estudios de evaluación de impacto ambiental y monitoreo de cuerpos de agua sería muy valiosa.

Bibliografía

- ASTM (2014). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM International, West Conshohocken, PA. <http://dx.doi.org/10.1520/E0729-96R14>.
- Bandara, J. M. R. S., Wijewardena, H. V. P., Liyanage, J., Upul, M. A., & Bandara, J. M. U. A. (2010). Chronic renal failure in Sri Lanka caused by elevated dietary cadmium: Trojan horse of the green revolution. *Toxicology Letters*, 198(1), 33–39.
- Beitinger, T.L. (1990). Behavioral reactions for the assessment of stress in fish. *Journal Great Lakes Research*, 16, 495-528.
- Bonifacio, A.F., Cazenave, J., Bacchetta, C., Ballesteros, M.L., Bistoni, M.A., Ame, M.V., Bertrand, L., Hued, A.C. (2016). Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to commercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. *Ecological indicators* 67, 88-97.

- Cazenave, J., Nores, M.L., Miceli, M., Díaz, M.P., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A. (2008). Changes in the swimming activity and the glutathione-S-transferase activity of *Jeninsiamultidentata* fed with microcystin-RR. *Water Research* 42, 1299-1307.
- Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, 309-315.
- Colman, J.R., Baldwin, D., Johnson, L.L., Scholz, N.L. (2009). Effects of the synthetic estrogen, 17-ethinylestradiol, on aggression and courtship behavior in male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 91, 346-354.
- de Diego, G., Ferro, J.P., Eissa, B.L., Ferrari, L. (2018). Estudio de parámetros sociales y nata-torios de *Cnesterodon decemmaculatus* para evaluar los efectos tóxicos del ibuprofeno. VI Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental de Argentina (SE-TAC). San Luis, Argentina. 16 al 19 de Octubre 2018, pp 230.
- de la Torre, F.R., Ferrari, L., Salibián, A. (2002). Freshwater pollution biomarker: comparative responses of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 131 (3), 271-280.
- de la Torre, F.R., Ferrari, L., Salibián, A. (2005). Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodondecemmaculatus*) applied to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere* 59, 577-583.
- Dell'Omo, G. (2002). *Behavioural Ecotoxicology*. Wiley. United Kingdom, 463 pp.
- Dipp, V.R., Valles, S., Ortiz-Kerberltt, H., Suarez, J.V., Bardullas, U. (2018) Neurobehavioral alterations in Zebrafish due to long-term exposure to low doses of inorganic arsenic. *Zebrafish* 15 (6), 575-585
- Drummond, R.A., Russom, C.L., Geiger, D.L., DeFoe, D.L. (1989). Behavioral and morphological changes in Fathead minnows (*Pimephales promelas*) as diagnostic endpoints for screening chemicals according to mode of action. *Aquatic Toxicology* 9, 415-435.
- Ferro, J.P. (2017). Estudio del comportamiento de peces como método para evaluar toxicidad ambiental. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Luján.
- Fonio, E., Golani, I., Benjamini, Y. (2012). Measuring behavior of animal models: faults and remedies. *Nature Methods* 9, 1167–1170.
- Eissa, B.L. (2009). Biomarcadores comportamentales, fisiológicos y morfológicos de exposición al cadmio en peces pampeanos. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Eissa, B.L., Ossana, N.A., Ferrari, L., Salibián, A. (2009). Quantitative behavioral parameters as toxicity biomarkers: fish responses to waterborne cadmium. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*, 58 (4) 1032-1039.
- Eissa, B.L., Ossana, N.A., Ferrari, L., Salibián, A. (2014). Effect of ibuprofen on the swimming pattern of *Cyprinus carpio*. *Fresenius Environmental Bulletin*. 23, 2549-2553.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews* 85, 97-177.

- Ferrari L. Eissa, B. L. Ossana, N.A, Salibián, A. 2009 Effects of sublethal waterborne cadmium on gills in three teleostean species: scanning electron microscope study. I. J. Env. H. 3 (4):410-427.
- Fleege, J.W., Carman, K.R., Nisbet, R.M. (2003). Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. Science of Total Environment 317, 207-233.
- Gilmour, K.M., Wilson, R.W., Sloman, K.A. (2005). The integration of behaviour into comparative physiology. Physiological and Biochemical Zoology 78, 669-678.
- Grillitsch, B., Vogl, C., Wytek, R. (1999). Qualification of spontaneous indirected locomotor behaviour of fish for sublethal toxicity testing. Part II. Variability of measurement parameters under toxicant-induced stress. Environmental Toxicology and Chemistry 18, 2743-2750.
- Grue, C.E., Gardner, S.C., Gibert, P.L. (2002). On the significance of pollutant-induced alterations in the behavior of fish and wildlife. In: Giacomo Dell’Omo (ed) Behavioural Toxicology. Wiley and Sons Pub. New York.
- Hill, R.W., Wyse, G.A., Anderson, M. (2016). Animal physiology. Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press, 4th edition.
- Hugget, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L. (1992). Biomarkers: Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publ., Chelsea, USA.
- Huang, Y., Guanghui, Z., Peng, L., Ni, W., Wang, X., Zhang, J., Wu, K. (2015). Effect of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenylether (BDE-47) on sexual behaviors and reproductive function in male zebrafish (*Danio rerio*). Ecotoxicology of Environmental Safety 111, 102–108.
- IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación), 2008. Calidad Ambiental-Calidad del agua- Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce. Método semiestático- Norma No. 29112/2008.
- Kane, A.S., Salierno, J.D., Brewer, S.K., (2005). Fish models in behavioral toxicology: automated techniques, updates and perspectives. In: Ostrander, G.K. (Ed.) Methods in Aquatic Toxicology, Volume 2 (Chapter 32). Lewis Publishers, Boca Raton.
- Kolok, A.S., Plaisance, E.P., Abdelghani, A. (1998). Individual variation in the swimming performance of fishes: an overlooked source of variation in toxicity studies. Environmental Toxicology and Chemistry 17, 282-285.
- Kolok, A.S. (1999). Interindividual variation in the prolonged locomotor performance of ectothermic vertebrates: a comparison of fish and herpetofaunal methodologies and brief review of the recent fish literature. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 56, 700-710.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade F. (eds) (1997). Biomarqueurs en Ecotoxicologie. Aspects fondamentaux. Masson, Paris.
- Llamazares Vegh, S., Lozano, I.E., Díaz, M.V., Gómez, M.I., Sánchez, S., Fuentes, C.M. 2019. The effect of supply and deprivation of food on the morphology, behaviour and nutritional condition of *Prochilodus lineatus* early larvae. Marine and freshwater research (En prensa).
- Meijide, F.J., Da Cuña, R.H., Prieto, J.P., Dorelle, L.S., Babay, P.A., Lo Nostro, F.I. (2018). Effects of waterborne exposure to the antidepressant fluoxetine on swimming, shoaling and anxiety

- behaviours of the mosquitofish *Gambusia holbrooki*. *Ecotoxicology and environmental safety* 163, 646-655.
- Melvin, S.D., Petit, M.A., Duvignacq, M.C., Sumpter, J.P. (2017) Towards improved behavioural testing in aquatic toxicology: Acclimation and observation times are important factors when designing behavioural test with fish. *Chemosphere*. 180, 430-436.
- Ossana, N.A., Eissa, B.L., Salibián, A. (2009). Short communication: cadmium bioconcentration and genotoxicity in the common carp (*Cyprinus carpio*). *International Journal of Environmental and Health* 3 (3), 302-309.
- Ossana, N.A., Eissa, B.L., Baudou, F.G., Castañé, P.M., Soloneski, S., Ferrari, L. (2016). Multibiomarker response in ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) exposed to Reconquista river water. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 133, 73-81.
- Peláez del Hierro, F., Veà Baró, J. (1997). *Etología*. Ediciones Pirámide. Madrid
- Ronco, A., Díaz Báez, C., Pica Granados, Y. (2004) Conceptos generales. En: *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de la calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Castillo Morales G (Ed) IMTA (México)-IDRE (Canadá). México, p 17-22.
- Salibián, A. (2014). Los fármacos como contaminantes emergentes de los ambientes acuáticos. *Revista de Farmacia y Bioquímica*. vol. 156 (1-2), 76-92.
- Scarcia, P., Calamante, G., de la Torre, F. (2014) Response of biomarkers of a standardized (*Cyprinus carpio*) a native (*Pimelodella laticeps*) fish species after in situ exposure in a periurban zone of Lujan River (Argentina). *Environmental Toxicology* 29, 545-557.
- Scott, G.S., Sloman, K.A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioral and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 38, 369-392.
- Sloman, K.A., Scott, G.R., Diao, Z., Rouleau, C., Word, C.M., McDonald, D.G. (2003). Cadmium affects the social behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology* 65, 171-185.
- Plaut I (2001) Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 131: 41-50.
- Speedie N, Gerlai R (2008). Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*. 188(1):168-177.
- Speedie, N., Gerlai, R. (2008). Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*. 188(1), 168-177.
- Svecevicius, G. (1999). Fish avoidance response to heavy metals and their mixtures. *Acta Zoológica Lituánica. Hydrobiología* 9, 103- 113.
- Vigliano, F.A., Aleman, N., Quiroga, M.I., Nieto, J.M. (2006). Ultrastructural characterization of gills in juveniles Argentinian Silverside, *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) (Teleostei: Atheriniformes). *Anatomy Histology Embryology Journal* 35, 76-83.
- Wang, Y., Ferrari, M.C.O., Hoover, Z., Yousafzai, A.M., Chivers, D.P., Niyogi, S. (2014). The Effects of Chronic Exposure to Environmentally Relevant Levels of Waterborne Cadmium on

- Reproductive Capacity and Behaviour in Fathead Minnows. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 67 (2), 181-191.
- Weis, J. S., & Candelmo, A. (2012). Pollutants and fish predator/prey behavior: A review of laboratory and field approaches. *Current Zoology*, 58(1), 9–20.
- Wendelaar Bonga, S.A. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77, 591-625.
- WHO (1992). *IPCS Environmental Health Criteria 135: Cadmium - Environmental aspects*, Geneva, World Health Organization.

TERCERA PARTE

Respuestas a nivel de los ecosistemas

CAPÍTULO 10

Efectos de los contaminantes sobre poblaciones

Federico Rimoldi

Introducción

Retomando las definiciones y objetivos de la ecotoxicología discutidos en los capítulos previos, uno de los principales desafíos de los ecotoxicólogos es estudiar y predecir los efectos que los contaminantes pueden ocasionar sobre las poblaciones naturales, y consecuentemente, sobre el resto de los niveles de organización supra-poblacionales. A pesar de esto, en general los estudios desarrollados en el campo de esta disciplina científica, son abordados desde un enfoque que dificulta la extrapolación de los resultados a condiciones reales. Por ejemplo, la obtención de puntos finales como el NOEC o LOEC a partir de un bioensayo de toxicidad, involucra la existencia o no de significancia estadística respecto a un grupo de individuos control, pero nos lleva a preguntarnos ¿Cuál es la relevancia de un efecto que resultó estadísticamente significativo sobre la viabilidad y desarrollo de una población natural de la especie? Esta pregunta adquiere más relevancia, si los puntos finales son estudiados en condiciones de laboratorio y no involucran aspectos comportamentales y reproductivos. Por otro lado, este tipo de efectos, ¿Qué valor predictivo tienen sobre el desempeño de una población en un ecosistema?

La ecología define a una población como un grupo de individuos de una misma especie que coexisten e interactúan en un mismo espacio y tiempo. Esto significa que se trata de un conjunto de individuos que comparten propiedades biológicas y ecológicas, que les dan una alta cohesión reproductiva y ecológica. La cohesión reproductiva implica el intercambio de material genético entre los individuos, mientras que la cohesión ecológica supone la presencia de interacciones entre ellos debido a que poseen requerimientos similares para la supervivencia y la reproducción. El límite físico referido en la definición previa, determina un aislamiento geográfico entre los organismos de diferentes poblaciones que puede ser superado sólo de manera ocasional, predominando entonces el movimiento libre de los organismos dentro del área geográfica que limita a la población. Esta dimensión espacial es incorporada en los estudios poblacionales a través del análisis de la distribución de los organismos en espacio “estructura poblacional”. Mientras que la dimensión temporal se manifiesta a través del análisis de la “dinámica de las poblaciones”, que se corresponde con el estudio de la variación en el tiempo de los atributos espaciales. Sin embargo, un mero agrupamiento de individuos en un mismo tiempo y espacio geográfico no deter-

minan que estemos en presencia de una población biológica. Las interacciones entre los componentes de un nivel de organización son fundamentales para definir al mismo, ya que determinan propiedades únicas (“**propiedades emergentes**”), que son incapaces de ser predichas por la simple suma de los componentes del nivel anterior. Así como el punto de fusión del agua no puede ser predicho a partir de la suma de los puntos de fusión de hidrógeno y el oxígeno, en una población existen ciertas propiedades emergentes que son particulares de este nivel de organización y que pueden ser estudiadas para conocer el estado de las mismas.

De esta forma, cualquier estudio poblacional (incluidos obviamente los que analizan los efectos de contaminantes sobre este nivel de organización biológico) debe incorporar el análisis de propiedades emergentes para poder efectuar conclusiones y predicciones sobre su comportamiento.

Estructura poblacional

Como se mencionó previamente la estructura de una población refiere al tamaño y distribución de los componentes de la misma en un espacio físico definido. Si bien esta definición no parece presentar dificultades, la determinación del espacio físico que pone límite a las poblaciones no siempre resulta sencilla y presenta un alto grado de subjetividad. La discusión en relación a los límites impuestos a una población es un debate aún irresoluto, por lo que en términos prácticos los límites que les son impuestos a las poblaciones para su estudio se realizan en general teniendo en cuenta principalmente cuestiones operativas relacionadas con el objetivo de estudio.

Medidas de tamaño poblacional

Uno de los componentes principales del estudio de la estructura de una población reside en conocer el tamaño (o abundancia) de la misma, la cual es el resultado de factores físicos del ambiente, de las relaciones intra e inter específicas y de la historia de vida de la población. La abundancia poblacional puede ser expresada de diferente forma de acuerdo al objetivo de estudio:

La **abundancia absoluta** se define como el número total de individuos en la población. Por ejemplo, la abundancia absoluta de la población de venado de las pampas (*Ozotoceros bezoarticus*) de la Bahía de Samborombón asciende a 200 individuos.

La **abundancia** puede también ser expresada en términos **relativos**, ya sea: en función del número de individuos de otras especies presentes en el área; como el número de individuos de una determinada edad en relación al número total de individuos de esa especie; o bien en relación a la intensidad de muestreo (horas hombre, horas trampa). Por ejemplo: Número de indivi-

duos/Unidad de captura, Número de individuos observados/Unidad de tiempo, número de huellas/metros recorridos, número de lechuzas/cueva, número de cantos/tiempo de observación, número de perros/habitante.

La **densidad poblacional** es otra medida del tamaño de la población en la que el número de individuos es expresado en función de la unidad de superficie o volumen. Por ejemplo, un estudio de diversidad de fitoplancton en el ambientes lóticos y lenticos de la localidad de Diamante (Entre Ríos) determinó que la densidad promedio de *Tribonema subtilissimum* (Xanthophyceae) fue de 86,5 individuos por μm^3 (Mirande y col., 2009).

En cualquiera de los casos, no siempre es posible el conteo directo del número de individuos (estimación directa), siendo necesario recurrir a la observación de indicios, como huellas, heces, nidos, daños a plantas, etcétera, para su estimación (estimaciones indirectas).

La **biomasa**, en términos poblacionales, es la unidad de materia orgánica acumulada en la población. Si bien estrictamente no representa una variable de relación directa con el tamaño poblacional, en los casos donde los individuos que componen la población presentan tamaños relativamente homogéneos, podría utilizarse como una aproximación. La biomasa está estrechamente relacionada con la productividad de la población estudiada, por lo tanto representa una variable muy útil a la hora de evaluar su estado.

Proporción de sexos

La proporción de sexo de una población indica la cantidad en términos relativos de machos y hembras presentes. Probabilísticamente, en una población de una especie que se reproduce sexualmente la proporción de sexos debería ser cercana a 1 (50% de Machos-50% de hembras). Sin embargo, esto no siempre es así ya que por cuestiones comportamentales la relación de sexos puede variar (competencia reproductiva). Esta proporción influye fuertemente sobre la presión de la selección sexual, ya que la intensidad de la competencia por la cópula depende de la cantidad de parejas sexuales disponibles. Por otro lado, teniendo en cuenta que en algunos casos los machos y hembras pueden presentar sensibilidad diferencial ante algunos contaminantes (por ejemplo en especies con marcado dimorfismo sexual por tamaño, la cantidad de un contaminante por unidad de masa va a variar entre macho y hembras si fueron igualmente expuestos), esto también puede ser un condicionante para una relación de sexos desigual.

Distribución horizontal

Patrón de distribución de los individuos en las poblaciones

Dentro de una población los individuos generalmente se distribuyen en el ambiente siguiendo 3 patrones generales (Figura 10.1.). Los determinantes de los patrones de distribución que asumen los individuos de una población tienen que ver con la distribución espacial de los recursos

que dichos individuos utilizan. Si bien estos patrones resultan mucho más evidentes en organismos sésiles o de baja movilidad, también pueden ser observados en organismos con gran capacidad de dispersión.

De esta forma los patrones de distribución generales son:

Azar: Todos los organismos igual probabilidad de ser hallados. Varianza (S^2) = media. En general es observable a baja escala espacial

Agrupada: Los organismos se distribuyen en grupos. Varianza (S^2) > media. Es el patrón predominante cuando se estudian grandes superficies. Este tipo de patrón se da en individuos cuya distribución es altamente dependiente del ambiente

Uniforme: se trata de un patrón generalmente artificial, que se da en poblaciones antropizadas (Ej. Cultivos). Varianza (S^2) < media. En los casos en los que esta distribución se da naturalmente, en general está asociada a una interacción negativa entre los organismos.



Figura 10.1: Representación gráfica de los patrones generales de distribución de organismos en una población

Estructura de edades

La estructura de edades de una población es la distribución porcentual de la composición etaria de la misma, es decir, el modo en que se distribuye el número total de individuos de la población en grupos de edades establecidas previamente por la persona que está realizando el estudio. Los grupos de edades puede tener unidades de tiempo diversas (años, meses, días, etc.); referirse a estados de desarrollo (en general para individuos de crecimiento discreto – Por ejemplo: huevo, larva 1, larva 2, pupa, adulto-); o a maduración reproductiva (Edades pre-reproductivas- juveniles, organismos potencialmente reproductores –Adultos-, edades post-reproductivas –seniles-), dependiendo del tipo de organismo estudiado. Si bien la estructura de edades de una población representa el estado de la misma en un momento dado (podría ser representado como una fotografía), y por lo tanto, es una variable descriptiva de la estructura poblacional, puede brindar algunos indicios sobre la dinámica de la misma. En la [Figura 10.2](#), se representan algunas de las principales morfologías que puede asumir una distribución de edades (pirámide de edades). Una población que asume una pirámide de edades de tipo “**progresiva**”, en la que hay más cantidad de individuos en las edades jóvenes y el número va disminuyendo hacia las edades superiores, sugiere que la misma se encuentra en crecimiento. Si no existen grandes

diferencias en el número de individuos de edades superiores y medias, la población se encuentra “**estacionaria**”; mientras que si la cantidad de individuos en edades juveniles es inferior a la de edades medias, la pirámide adquiere una forma “**regresiva**”, y la población estaría decreciendo.

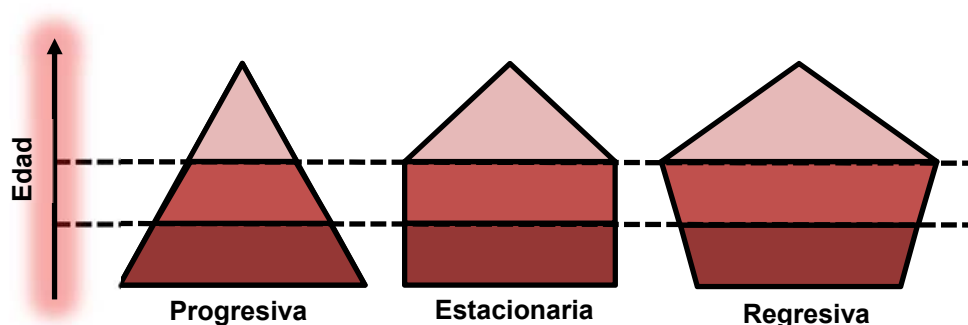


Figura 10.2: Pirámides de edades generales que puede presentar una población

Dinámica poblacional

Como se ha venido mencionando, el tamaño de una población es uno de las principales variables que describen su estructura. Si alguna de las medidas directa de abundancia (número de individuos, densidad) se expresa en función del tiempo (de manera total o parcial), se obtiene una curva poblacional, que describe la forma en que la población varía en el tiempo.

El número de individuos existente en un momento dado en una población, depende del balance entre los individuos que se incorporan (nacimientos e inmigración) y los que salen de la misma (muertes y emigración). Si bien la influencia de los fenómenos migratorios en el tamaño de una población puede ser muy grande, desde el punto de vista ecotoxicológico estos factores en general son poco relevantes en relación a la mortalidad y natalidad, que son variables de afectación directa por los contaminantes.

La mortalidad (y consecuentemente la supervivencia) poblacional, puede ser expresada de diferentes maneras, lo cual dependerá no sólo de la finalidad del estudio y la especie estudiada, sino también de la posibilidad de obtener información. A continuación, se resumen algunas de las tasas de mortalidad más comúnmente utilizadas:

Tasa de mortalidad bruta: número de muertos en relación al total de individuos. Es una de las formas de expresión de la mortalidad más simple, pero también menos informativa. Permite realizar consideraciones generales de la población en estudio. Por ejemplo, a la hora de evaluar los efectos de un xenobiótico sobre una población natural (o una población experimental de laboratorio), ésta es una de las más utilizadas para comparar con una población control, y permite visualizar efectos en general agudos producidas por dosis altas. Sin embargo, esta expresión no brinda mayor detalle sobre las edades (o estadios), o sexo más susceptibles.

Tasa de mortalidad específica por sexo: mortalidad de machos o hembras respecto del total. Ocasionalmente, en estudios de toxicidad, la tasa de mortalidad por sexos puede brindar una primera aproximación de los potenciales efectos sobre el tamaño poblacional en la siguiente generación, pero para esto se debe tener un buen conocimiento de la dinámica poblacional de la población no expuesta.

Tasa de mortalidad específica por causas: mortalidad expresada en función del agente que la genera. Se refiere a la probabilidad de morir que tiene un individuo de la población, en un período de tiempo como resultado de una causa particular. Es muy útil a la hora de determinar la influencia relativa de diferentes agentes de mortalidad en poblaciones de campo. En el ámbito de la ecotoxicología permite diferenciar los efectos reales de un contaminante sobre la supervivencia de la población, de la mortalidad asociada a otras causas.

Tasa de mortalidad específica por edad: se trata del porcentaje de individuos que mueren en una determinada edad (rango de edad o estadio de desarrollo). En estudios ecotoxicológicos esta expresión de la mortalidad es muy útil a la hora de determinar los estadios más susceptibles – o más resistentes- de una especie a un contaminante particular.

Todas estas tasas de mortalidad pueden también ser expresadas por períodos de tiempo infinitesimalmente pequeñas, de forma de obtener tasas instantáneas.

Tablas de vida

Las tablas de vida son una forma de expresar la mortalidad por edades de manera ampliada, que permite además calcular una serie de parámetros poblacionales que tienen gran valor descriptivo y predictivo de la dinámica poblacional. Históricamente, los efectos de los contaminantes sobre la supervivencia de los individuos, ha sido la principal variable de análisis utilizada en los estudios ecotoxicológicos. Con el paso del tiempo, el estudio de variables subletales ha ido ganando cada vez más terreno, permitiendo de esta forma conocer efectos a concentraciones más bajas. En los últimos años, los estudios ecotoxicológicos han ido adquiriendo bases ecológicas más firmes, haciendo hincapié cada vez más en parámetros relacionados con el *fitness* del organismo y con parámetros demográficos y respuestas funcionales.

En las siguientes secciones se resumirán las principales herramientas utilizadas para estudios demográficos. Si bien en los últimos años las tablas de vida se han actualizado (tablas de vida para ambos sexos) y existen herramientas informáticas que facilitan notoriamente los cálculos (Huang y Chi, 2011), aquí se presentarán las consideraciones básicas de manera que el lector adquiera las bases conceptuales de cada parámetro, y de esta manera pueda actuar en consecuencia.

La tabla de vida es una herramienta que fue concebida y utilizada originalmente para análisis demográficos de poblaciones humanas. El hecho de permitir el cálculo de la esperanza de vida, resultó para las compañías de seguro, una herramienta muy útil para presupuestar los seguros de vida de las personas. Fue Deevery en el año 1947, el primero en poner en vista de los ecólogos la posibilidad de usar estas herramientas en ecología de animales.

Una tabla de vida es una síntesis de las estadísticas de mortalidad, supervivencia y fecundidad por edad de una población. Desde punto de vista metodológico es un herramienta muy sencilla ya que consiste en: 1) determinar *a priori* “edades”⁴; 2) contar y registrar el número total de individuos vivos que alcanza cada una de esas “edades”; y 3) para las edades reproductivas contar el número de “descendientes” que aportan los individuos de cada edad. Teniendo en cuenta que en la mayoría de las especies la proporción de sexos es cercana a 1, y que en cuestiones reproductivas el papel determinante lo juegan las hembras, los modelos tradicionales para la confección de tablas de vida consideran que la población está formada enteramente (y exclusivamente), por hembras. Sin embargo, también, existen modelos que permiten la confección de tablas de vida que consideran ambos sexos (estos son particularmente útiles para especies con distinta proporción de machos y hembras).

Teniendo en cuenta la metodología que se debe utilizar para recabar la información necesaria para la construcción de la tabla de vida, existen 2 tipos de tablas:

Tabla de Vida Específica por Edades – Horizontal: donde el registro del número de individuos que ingresa a cada una de las edades determinadas *a priori*, se realiza a partir del seguimiento de una cohorte⁵ real, desde el inicio de la misma hasta la muerte del último organismo.

Tabla de Vida Temporal – Vertical: No siempre es posible el seguimiento completo de una cohorte real de organismos. Por ejemplo, hay especies que tienen ciclos de vida tan largos que sería imposible (e incluso irrelevante), el seguimiento de una cohorte real. ¿Cómo haría un investigador para realizar el seguimiento completo de una cohorte de una población de tortugas terrestres que pueden llegar a vivir más de 100 años?. En casos como estos, la información para elaborar la tabla de vida se realiza considerando una cohorte imaginaria que se construye a partir de la estructura de edades de la población. Es decir, se considera que el número de individuos que ingresa a cada edad, es justamente el número de individuos que hay para cada edad en el momento en que se elabora la estructura de edades. En otras palabras, se utiliza la información tomada en un momento para elaborar una serie temporal. A pesar que este procedimiento presenta evidentes limitaciones, es una alternativa válida cuando es imposible construir una tabla de vida horizontal, siempre y cuando la población se encuentre estacionaria (no crece ni decrece) y presente superposición de generaciones.

La [Tabla 10.1](#) resume algunos de los parámetros más importantes que pueden calcularse con una tabla de vida (Ravinovich, 1978). Más adelante se brindará más detalle de los parámetros más importantes utilizados en el ámbito de la ecotoxicología.

⁴ En este caso como se ha mencionado precedentemente en este capítulo, el término “edades” puede referirse a rango de edades, estadios de desarrollo o cualquier rango temporal que puede ser medido o estimado en forma directa o indirecta (tamaño, anillos de crecimiento, etcétera) en el grupo de organismos estudiado. La cantidad de “edades” a utilizar, dependerá tanto de la especie estudiada como de los objetivos de estudio.

⁵ Conjunto de individuos de una población nacidos en la misma fecha

Tabla 10.1. Resumen de los parámetros poblacionales que pueden ser calculados en una tabla de vida

Símbolo	Definición	Cálculo ⁶
X	Edad	Se establecen <i>a priori</i>
N_x	Número de organismos vivos al inicio de la edad x	Debe contarse en la población de estudio
L_x	Proporción (o probabilidad) de sobrevivientes a la edad x.	$\frac{N_x}{N_{x-1}}$
D_x	Número de muertos en un intervalo de edad	$N_{x-1} - N_x$
Q_x	Probabilidad de morir entre las edades x-1 y x	$\frac{dx}{N_x - 1}$
L_x	Media de la probabilidad de sobrevivencia entre 2 edades sucesivas.	$\frac{lx + lx-1}{2}$
T_x	Tiempo que le quedan de vida a los sobrevivientes que han alcanzado la edad x. m=máxima edad alcanzada.	$\sum_m^x L_x$
E_x	Esperanza de vida. Tiempo que le queda por vivir en relación a la probabilidad de haber llegado vivo a esa edad	$\frac{T_x}{lx}$
k_x	Fuerza de la mortalidad	$\log_{10}N(x-1) - \log_{10}N_x$
F_x	Fecundidad total de la edad x.	N° de descendientes. Debe contarse en la población en estudio
m_x	Fecundidad individual. Es la fecundidad medida como N° promedio de crías totales por individuo o de crías hembras nacidas por hembra de edad x.	$\frac{F_x}{N_x}$
R_o	Tasa de reproducción o de reemplazo	$\sum lx \times mx$
T_c	Tiempo generacional de la cohorte (Ej.: de puesta a puesta)	$\sum \frac{lx \times mx}{R_o}$
R	Tasa instantánea de crecimiento poblacional.	$Ln \frac{R_o}{T_c}$
V_x	Valor reproductivo.	$\frac{e^{rx}}{lx} \times \sum e^{-ry} ly my$

⁶ Los algoritmos que se presentan se utilizan para especies de crecimiento discreto. Para poblaciones de especies que crecen en forma continua, la fórmula para calcular alguno de los parámetros es diferente a la presentada en la tabla.

Tasa neta de reproducción o de reemplazo. Representa la capacidad de reproducción de **una población** en el lapso de una generación. En otras palabras, indica la capacidad que tiene esa población de reemplazarse a sí misma en una generación. El valor obtenido cuando se calcula este parámetro indica las veces la que población es capaz de reemplazarse. De esta manera si:

$R_o > 1$. Población crece.

$R_o = 1$. Población estable

$R_o < 1$. Población decrece

Si observamos cómo se calcula este parámetro, se puede ver que las edades pre y post reproductivas no contribuyen a la siguiente generación ($m_x=0$), ya que en la sumatoria esas edades anulan el término.

$$R_o = \sum l_x \times m_x$$

Este es uno de los parámetros más utilizados en estudios de toxicidad sobre poblaciones animales (Schneider et al, 2009). Es altamente sensible a efectos en la supervivencia y reproducción de los organismos y tiene un alto valor predictivo, permitiendo conocer el impacto de los contaminantes en las siguientes generaciones de la población en estudio.

Tiempo generacional: Se define como el tiempo promedio entre 2 generaciones sucesivas. Si la reproducción es discreta este parámetro se mide como el tiempo promedio que demoran los individuos en alcanzar la misma edad en 2 generaciones sucesivas (Por ejemplo, se puede tomar como el período entre el estado de huevo de la generación 1 y el estado de huevo de la generación 2). En los casos en que la reproducción es continua, medir el tiempo de la manera mencionada anteriormente resulta muy difícil, entonces se calcula de la siguiente forma:

$$T = \frac{\sum x \times l_x \times m_x}{\sum l_x \times m_x}$$

En muchos organismos se ha observado que algunos contaminantes producen alteraciones en los tiempos normales de desarrollo (Desneux et al., 2007; Rimoldi et al., 2008, 2017). No siempre resulta sencillo entender cuáles son las implicancias poblacionales asociadas a las alteraciones significativas de este parámetro, para esto hay que tener en cuenta que los seres vivos son sistemas biológicos altamente regulados (física, química y temporalmente), en los que por ejemplo existen una coordinación temporal en la maduración sexual (entre machos y hembras y entre diferentes poblaciones de la misma especie), cuyo desfasaje puede atentar contra el éxito reproductivo. Asimismo, algunas especies requieren de otras especies para dispersarse (polinizadores), las alteraciones en los tiempos normales de desarrollo pueden llevar a problemas de coordinación interespecífica que limiten la capacidad dispersiva de los individuos de una determinada población.

Tasa Intrínseca de incremento natural: es una tasa instantánea de crecimiento de la población. Se define como la capacidad potencial o máxima de crecimiento de una población en condiciones ilimitadas. Indica para cada tiempo infinitesimalmente pequeño si la población crece, está estable, o decrece, y se calcula como sigue:

$$1 = \sum l_x \times m_x \times e^{-rx}$$

Si observamos la formula no existe una expresión que permita despejar r de forma directa. Como todas las variables se conocen (l_x , m_x , y x) y solo hay 1 incógnita (r), este parámetro podríamos calcularlo, de las siguientes formas:

- Por *prueba y error*, es decir realizar la sumatoria con diferentes valores de r hasta que de 1, lo cual sería un trabajo bastante tedioso.
- Obtener el valor de r de la fórmula que expresa el crecimiento de las poblaciones en condiciones ilimitadas (crecimiento exponencial):

$$N_t = N_o \times e^{rt}$$

Donde;

N_t : número de individuos en un tiempo determinado

N_o : Número de individuos inicial

De la expresión anterior puedo despejar r como sigue:

$$N_t = N_o \times e^{rt} \rightarrow \ln N_t = \ln N_o + (-r \times t) \rightarrow r = \ln \frac{N_t/N_o}{t} \text{ o } r = \ln R_o/T$$

Entonces sí:

$r < 0$ La población está decayendo

$r = 0$ La población está estable

$r > 0$ La población está creciendo

Ahora bien, como se mencionó antes, una población en condiciones ilimitadas crece de manera exponencial ([Figura 10.3.](#)). Esta es una condición inexistente en la naturaleza, aunque en determinadas ocasiones y **por lapsos de tiempo relativamente cortos**, algunas poblaciones pueden crecer de esta manera (Ejemplo, poblaciones de bacterias en laboratorio). Pero siempre en definitiva, el ambiente termina limitando el crecimiento de las poblaciones (recursos alimenticios finitos, hacinamiento, etcétera), existiendo entonces para cada hábitat una capacidad de carga⁷ (K).

⁷ Capacidad de carga K : número máximo de individuos de una población que ese hábitat puede contener. Depende de los recursos disponibles (nutrientes, agua, espacio físico, etcétera)

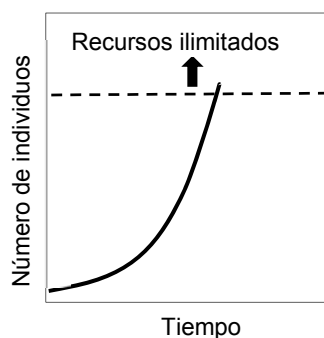


Figura 10.3. Crecimiento poblacional de tipo exponencial

De esta forma, la **tasa intrínseca de crecimiento** de una población en condiciones ilimitadas, se comporta de la siguiente forma:

$$r = r_0 - b N$$

Donde r_0 y b son constantes. Como se mencionó, cuando una población alcanza la capacidad de carga del ambiente, no sigue creciendo, es decir $N=K$, entonces en este caso, de la fórmula anterior se desprende que:

$$0 = r_0 - b K \rightarrow b = \frac{r_0}{K} \rightarrow r = r_0 - r_0 \times \frac{N}{K}$$

Al igual que la tasa neta de reemplazo, la tasa instantánea de crecimiento es uno de los parámetros más importantes en ecología de poblaciones, y es muy sensible a efectos de contaminantes (si afectan supervivencia o fecundidad). A diferencia de la tasa de reemplazo, esta es una tasa instantánea, por lo tanto permite mostrar de qué manera los contaminantes están afectando el crecimiento poblacional en ese momento. Por otro lado, este parámetro es muy sensible a factores dependientes de la densidad poblacional. La expresión siguiente muestra que en una población que crece en forma ilimitada, el número de individuos en un determinado tiempo está dado por:

$$\frac{dN}{dt} = r(t) \times N(t) \rightarrow r = \frac{1}{N} \times \frac{dN}{dt}$$

Cuando existen factores densodependientes:

$$r = r_0 - r_0 \times \frac{N}{K} \text{ por lo tanto } \frac{dN}{dt} = r_0 \times N \times 1 - \left(\frac{N}{K}\right)$$

De esta forma, cuando la población es pequeña y hay gran disponibilidad de recursos, N tiende a cero, y el término $\frac{N}{K} \cong 0$ y $\frac{dN}{dt} = r_0 \times N$. Es decir, la población crece exponencialmente (Figura 3). Por el contrario, cuando los recursos limitan el crecimiento N tiende a K , y el término $\frac{N}{K} \cong 1$ y $\frac{dN}{dt} = 0$, por lo tanto la población no crece. Entonces, el crecimiento poblacional que describe la ecuación $\frac{dN}{dt} = r_0 \times N \times 1 - \left(\frac{N}{K}\right)$ es de tipo logarítmico (Figura 10.4.) e incorpora la limitación de los recursos para las poblaciones.

Como se observa en la figura cuando la población es pequeña el crecimiento es exponencial (r se incrementa), a medida que se incrementa el número de individuos, la población sigue creciendo, pero a una tasa menor hasta alcanzar un crecimiento lineal (r constante), y luego el crecimiento se desacelera (r decrece) hasta alcanzar la capacidad de carga (K) alrededor de la cual el número de individuos oscila.

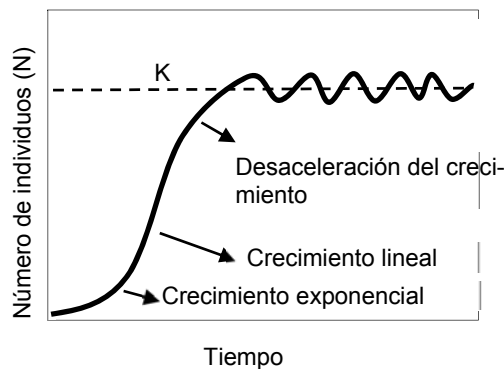


Figura 10.4: Crecimiento poblacional de tipo logístico

Desde el punto de vista ecotoxicológico, las poblaciones expuestas a agentes contaminantes suelen presentar alteraciones en las curvas de crecimiento. Del mismo modo, la presencia de contaminantes en el medio altera la capacidad de carga del ambiente. Por ejemplo, un cuerpo de agua superficial eutrofizado puede presentar un incremento en la capacidad de carga de la población de ciertas especies (algunas bacterias y algas - por incremento del nivel de nutrientes disponibles) y una disminución en este parámetro para otras especies (peces - por disminución del oxígeno disuelto).

Valor reproductivo. Indica la contribución (en individuos) de cada una edad determinada a la siguiente generación. En los casos en que la tabla de vida se construya sólo con hembras, la contribución se refiere al número de hembras promedio que aporta cada hembra de una edad determinada.

Este parámetro se calcula de la siguiente forma:

$$V_x = \frac{e_{rx}}{l_x} \times \sum e - r_y l_y m_y \text{ o bien } V_{x0} = \frac{\text{Nº de hembras producidas x hembras de edad } x \text{ o mayor}}{\text{Nº de hembras de edad } x}$$

Donde, y se usa para denotar todas las edades de las hembras desde la edad x hasta el infinito. Nótese que si el individuo muere en edad post-reproductiva, la contribución será nula (salvo social) y $V_x=0$. Si se elimina una hembra joven que está **por iniciar la edad reproductiva** el efecto en la siguiente generación será considerable y el valor reproductivo será el máximo. Este parámetro es muy importante ya que permite conocer las edades que más aportan a la preservación de la población en el tiempo. Si por ejemplo un contaminante ejerce un efecto diferencial superior sobre los organismos de una población cuando están en las edades donde V_x es alto, el impacto a futuro sobre la población será mayor que si los efectos son en edades con V_x inferiores. Además, este parámetro permite seleccionar en que edades se deben incrementar los esfuerzos de protección de una población para minimizar su daño.

Consideraciones generales

Si bien como se mencionó al inicio del capítulo los estudios ecotoxicológicos en los últimos años han ido incorporando de a poco, bases ecológicas cada vez más firmes, todavía el uso de herramientas de la ecología clásica en estudios de toxicidad es incipiente y mayormente son aplicadas en estudios de laboratorio en los que se comparan poblaciones (de laboratorio) expuestas y no expuestas a contaminantes individuales. Si bien la ventajas de utilizar estos métodos son evidentes, ya que permiten detectar efectos de contaminantes no perceptibles a corto plazo; visualizar posibles consecuencias de efectos subletales a nivel poblacional; y los parámetros poblacionales obtenidos tienen alto valor predictivo, presentan algunas desventajas operativas que pueden ser una de las principales causas por las que estos métodos aún no se han extendido completamente. Entre estas, se debe considerar que los estudios demográficos suelen ser muy costosos tanto económica como temporalmente, y que son sólo realizables, para fines ecotoxicológicos, para organismos con ciclos biológicos reducidos.

Por otro lado, los bioensayos ecotoxicológicos de laboratorio rara vez estudian los efectos de los contaminantes conjuntamente con factores demográficos densodependientes (competencia intraespecífica, disponibilidad de hábitat, alimentos, etcétera), que junto a los factores que determinan la biodisponibilidad de los contaminantes, son los principales condicionantes de los efectos diferenciales observados en condiciones de laboratorio y campo. Por lo tanto, si bien los estudios de laboratorio son una primera herramienta fundamental para conocer los efectos de un contaminante sobre una población, la extrapolación de los resultados obtenidos en esas condiciones a una población natural, requiere estudios adicionales que incorporen de manera secuencial complejidad al sistema de estudio (estudios de semi-campo y campo). Los estudios poblacionales en condiciones de campo requieren de conocimientos de técnicas de muestreo específicas que son fundamentales para obtener resultados confiables y representativos, algunos de los cuales se resumen a continuación.

Herramientas para el estudio de poblaciones naturales

A la hora de conocer el tamaño de una población una opción es realizar un “**censo poblacional**” en la que se realiza el conteo total de los individuos que la conforman. Operativamente, en general el área de muestreo se divide en parcelas y se realiza el conteo de la totalidad de individuos existente en cada parcela y luego se suman. Para individuos de gran tamaño y que se disponen en grupos pueden utilizarse muestreos aéreos. Sin embargo, esta metodología no siempre es aplicable cuando se trabaja con poblaciones numerosas, grandes extensiones territoriales, o individuos pequeños. Además, en el caso de los animales, se debe tener en cuenta que pueden cometerse errores si los individuos se mueven entre las parcelas durante el conteo. En estos casos el tamaño poblacional se estima a partir de muestreos.

Si consideramos que la población es el conjunto de todos los individuos que queremos estudiar y a partir de los cuales intentamos sacar conclusiones, una **muestra** es una parte representativa de esta población que nos permite obtener resultados válidos (Figura 10.5.).

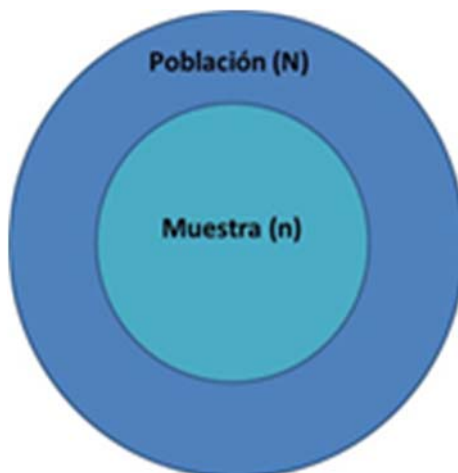


Figura 10.5: Representación gráfica de una población y una muestra.

Diseño de muestreo

Existen diversos métodos y herramientas para el muestreo de poblaciones naturales. En la presente sección se resumen algunos de los métodos más utilizados mencionando las principales características de estos, para que el lector adquiera una idea general de los mismos. No existe un criterio general para la selección del método de muestreo a utilizar, sino que esto se realiza dependiendo de los individuos (organismos sésiles o móviles), la matriz ambiental en la que se distribuyen los organismos (suelo, agua, aire), disponibilidad de equipamiento, entre otras cuestiones; sin embargo, en todo caso debe tenerse en cuenta que **el éxito del muestreo depende mucho de la claridad con la que se plantee el problema para poder optimizar tiempo y recursos**. La primera gran diferenciación que se puede realizar entre los métodos de muestreo, tiene que ver con el post-tratamiento estadístico de la información que se obtiene del muestreo. De esta forma existen:

Métodos informales: sin tratamiento estadístico (muy dependiente de la experticia del investigador – estimación de cobertura, fisonomía, etcétera.)

Métodos formales: con tratamiento estadístico. Más objetivo, requiere más tiempo, detecta cambios menos evidentes, permiten conocer errores e incertidumbres, y reduce cantidad de datos – estadística descriptiva.

Uno de los factores preponderantes a tener en cuenta a la hora de realizar un muestreo es la **representatividad**, es decir, el grado en el que la muestra representa las características del sistema de estudio. En líneas generales la representatividad depende de la distribución de los organismos, del tamaño de la muestra; del tamaño, forma y número de unidades muestrales. Es por esto que surgen las siguientes preguntas: ¿cuál es el área mínima que debo muestrear para que el muestreo sea representativo de la población? ¿Cuál es el tamaño, forma y número de unidades muestrales que debo utilizar? ¿Cómo debo distribuirlas?

Número de unidades muestrales

El número de unidades muestrales (UM) que se deben utilizar para lograr un muestreo representativo, implica un compromiso entre la precisión de la/s variable/s a analizar y el esfuerzo de muestreo. Es decir, lo ideal sería utilizar el menor número de UM necesarias para que la variable recolectada sea representativa. Para esto, existen **criterios subjetivos** (Por ejemplo un porcentaje de la superficie total) que dependen mucho de la experticia de la persona que lo lleva a cabo y del conocimiento del área; y **métodos objetivos** que permiten obtener de manera más rigurosa el número mínimo de UM necesarias, sin necesidad de conocer el área de estudio. Entre estos, uno de los métodos más difundidos consiste en realizar muestreos preliminares de la variable a analizar, graficando el valor medio de la misma (Por ejemplo, número de individuos) en función del número de UM, el punto de inflexión en el que el valor medio no se modifica con el incremento del número de UM, representa el número mínimo de UM necesarios para que el muestreo sea representativo (Figura 10.6.).

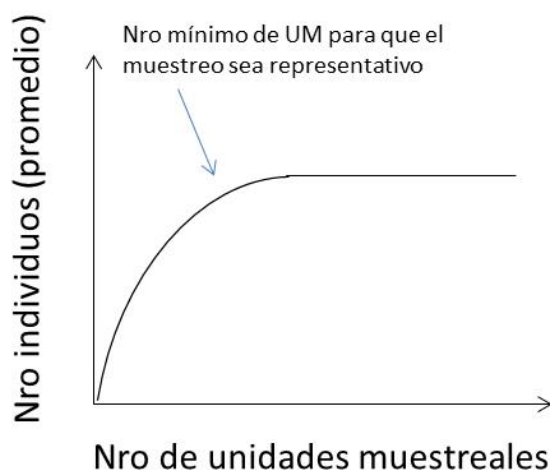


Figura 10.6: Representación gráfica de uno de los métodos objetivos para determinar el número mínimo de UM.

Tamaño y forma de las UM

Tanto la forma como el tamaño de las UM que un operador decide utilizar depende del objetivo de muestreo (Ejemplo, si se desea muestrear individuos de pequeño tamaño se prefieren UM pequeñas), y del patrón de distribución espacial de los organismos (El patrón aleatorio el tamaño no modifica exactitud, pero el agrupado sí). En relación a la **forma de las UM** entre las principales se destacan los siguientes:

Muestreo areal: consiste en la selección de parcelas de diferente forma dentro de los cuales se realiza en conteo o medición de la variable a analizar. Este tipo de métodos es muy utilizado para toma de muestras no destructivas, sin embargo una de las limitaciones más importantes que presenta es el efecto borde, es decir, el conflicto al que el operador se enfrenta a la hora de considerar un individuo dentro o fuera de la parcela cuando se encuentra en contacto con el límite de la UM. Este tipo de efecto resulta particularmente importante en el muestreo de organismos sésiles, depende fuertemente de la relación superficie/volumen, y por lo tanto, se incrementa conforme disminuye el tamaño de la UM (Figura 10.7.).



Figura 10.7: Representación gráfica del muestreo areal.

Muestreo por transectas: Se trata de UM lineales en las que se resuelve el problema del efecto borde y de las formas de la UM. Dentro de este grupo existen distintos tipos de muestreo; por ejemplo, un operador puede desplazarse por la transecta y realizar el conteo de individuos dentro de su campo visual o en forma indirecta a través sonidos; mientras que en otros estudios (comúnmente usados para para estimar cobertura o área basal), el conteo de individuos o variables deseadas de éstos, se realiza por intersección del mismo con la transecta (Figura 10.8.).

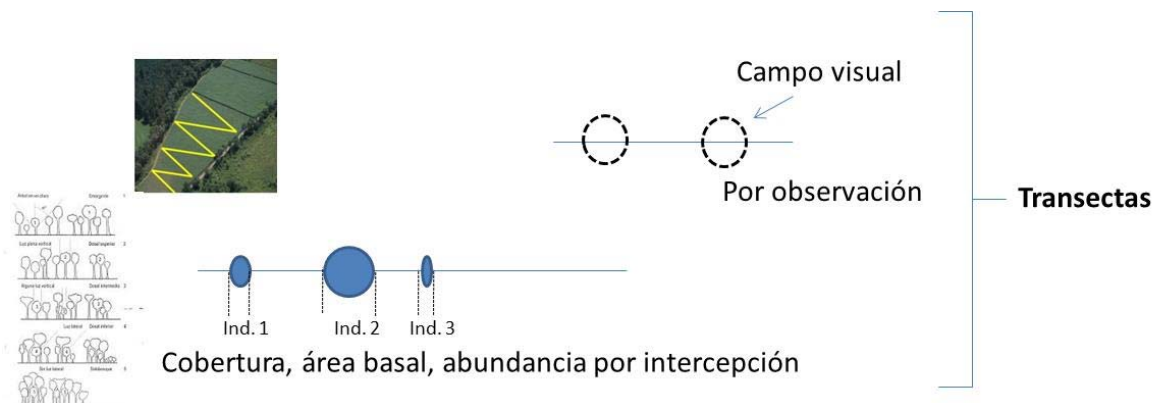


Figura 10.8. Representación gráfica del muestreo por transectos.

Muestreo por individuo: Este tipo de muestreo no puede ser utilizado para estimar el tamaño poblacional, pero es frecuentemente utilizado para estimar otro tipo de variables como cobertura, área basal, biomasa, DAP, etcétera. En estos casos, se buscan en el campo los individuos y sobre estos se estima la variable de interés.

Muestreo Point quadrats: Se trata de una técnica de muestreo de vegetación utilizado fundamentalmente para medir cobertura, a partir de la intersección de varillas que son regularmente insertadas en el suelo.

Modelos para medición de distancias: Se trata de un método para estimar densidad poblacional en organismos sésiles, que consiste en disponer puntos sobre el terreno (pueden ser dispuestos al azar o sistemáticos sobre una línea de transecta), y medir el o los individuos más cercanos a este punto (Figura 10.9.). A partir de esta información se estima la densidad poblacional a partir de diferentes algoritmos relacionados al modelo seleccionado.

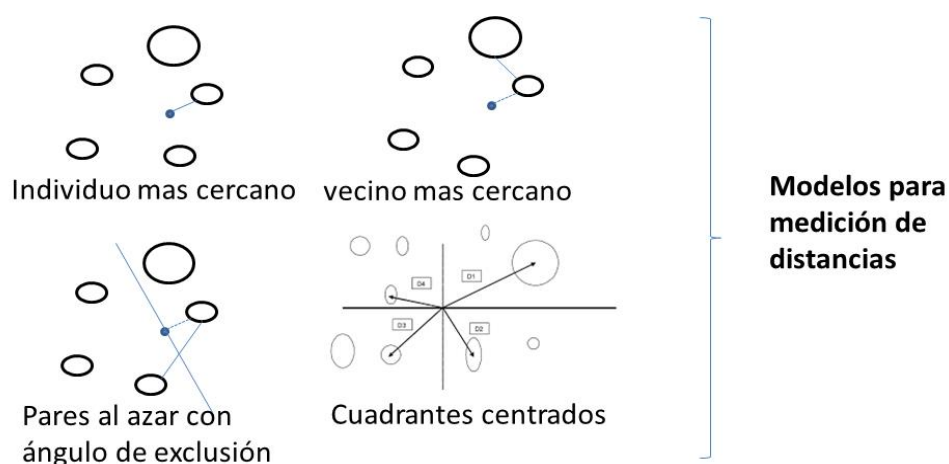


Figura 10.9: Representación gráfica de los modelos de muestreo de medición de distancias.

Métodos de captura marcaje y recaptura: Se trata de métodos utilizados para estimar abundancia en poblaciones de animales en las que no es posible hacerlo a partir del simple conteo todos los individuos. Consisten en la captura de individuos de la población, los cuales son marcados y liberados. La recaptura de estos individuos en posteriores capturas permite inferir el tamaño de la población, a partir del número total de individuos recapturados y en relación al total de capturas efectuadas.

Ubicación de las UM

Existen diferentes estrategias de muestreo de poblaciones en relación de la ubicación de las UM, la elección de la estrategia a utilizar en un muestreo poblacional, depende de los objetivos del mismo. A continuación se resumen algunas de las estrategias existentes y las características de cada una de ellas que condicionan su elección:

Muestreo aleatorio simple: Es el tipo de muestreo más fácil para llevar a cabo, consiste en seleccionar la ubicación de las unidades muestréales por sorteo, de manera tal que cualquier sitio tiene la misma probabilidad de contener una UM (Figura 10). Entre los problemas más conspícuos asociados a esta metodología se destaca que la ubicación de la UM puede aleatoriamente caer en un sector inaccesible para el operador. Además, este método presenta más error en poblaciones heterogéneas; sin embargo, es más adecuado para distribución aleatorio de datos.

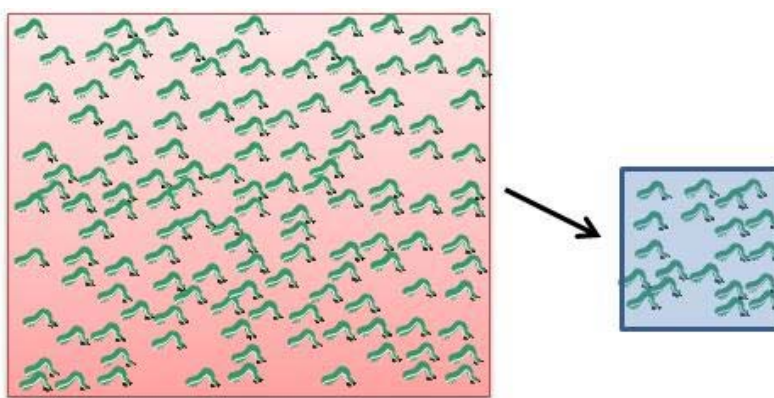


Figura 10.10. Representación gráfica del muestreo aleatorio simple.

Muestreo aleatorio sistemático: En este tipo de muestreo se elige al azar el primer punto y la selección de los individuos se realiza siguiendo un patrón sistemático (Figura 10.11). Este es un método adecuado cuando se muestrea una población que sigue patrones espaciales (altitudinales, plumas de contaminación, etcétera).

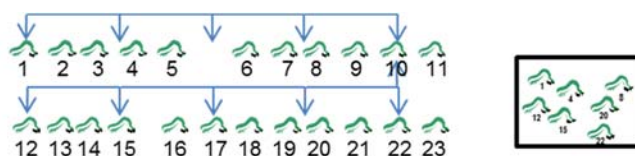


Figura 10.11: Representación gráfica del muestreo aleatorio sistemático

Muestreo aleatorio estratificado: En este caso, el área de distribución de la población presenta distintos estratos, en cada uno de estos se realiza un muestreo aleatorio (Figura 10.12.). En general, los estratos están relacionados con alguna característica ambiental, aunque este tipo de muestreos también es utilizado para conocer estratos de edades susceptibles.

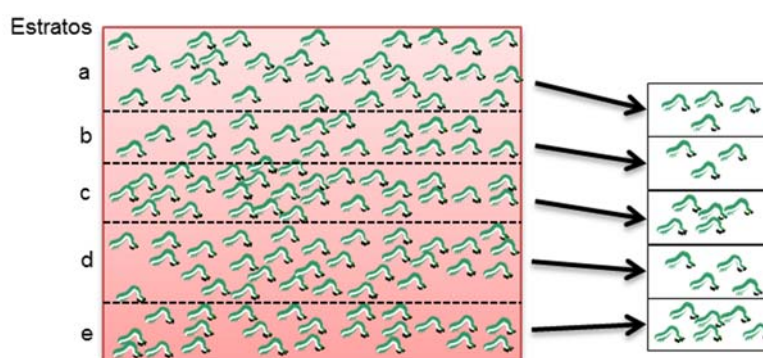


Figura 10.12. Representación gráfica del muestreo aleatorio estratificado.

Muestreo aleatorio por conglomerados: Este es un tipo de muestreo es utilizado para poblaciones de estructura compleja en la que se seleccionan conglomerados *a priori*, y dentro de ellos se hacen muestreos aleatorios (Figura 10.13.). La elección de la distribución de las UM bajo este criterio es muy adecuada en poblaciones con patrones de distribución agregados.

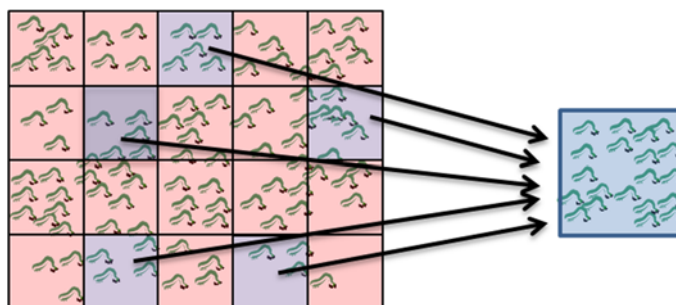


Figura 10.13: Representación gráfica del muestreo aleatorio por conglomerados.

Muestreo selectivo: En este tipo de muestreo, los elementos que formarán parte de la muestra son seleccionados según criterio especificado previamente. Es un tipo de muestreo utilizado

para evaluar el comportamiento de alguna variable en individuos que presentan una característica particular (Figura 10.14.). Por ejemplo, puede desearse estimar el crecimiento de los individuos de la población que presentan una cloración más oscura.

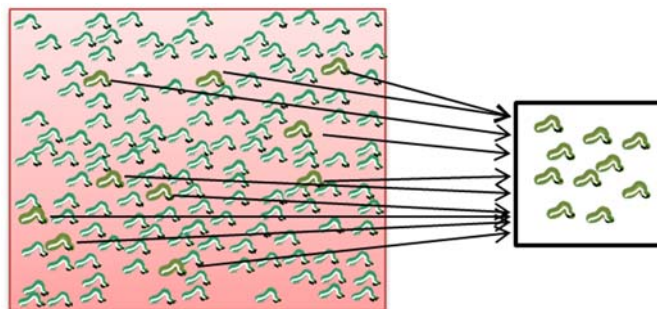


Figura 10.14: Representación gráfica del muestreo selectivo.

Muestreo secuencial: Las UM se disponen en el mismo sitio secuencialmente en diferentes tiempos (Figura 10.15.). Es un tipo de muestreo muy utilizado para comparar el comportamiento de la población a lo largo del tiempo (Ejemplo, comportamiento estacional).

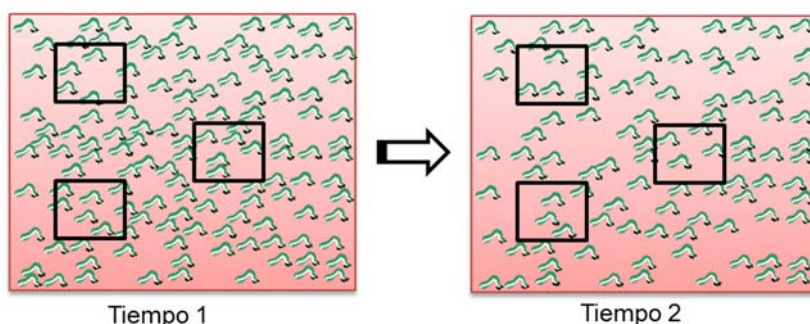


Figura 10.15: Representación gráfica del muestreo secuencial.

Metapoblaciones

Desde finales del siglo 20, en el ámbito de la ecología de la conservación ha ido ganando terreno el concepto de metapoblación, como un nivel de organización intermedio entre el poblacional que hemos discutido a lo largo del presente capítulo, e inferior al de comunidad. Una metapoblación es un conjunto de “poblaciones locales” o sub poblaciones de la misma especie, cercanas espacialmente, que se distribuyen en forma de parches e intercambian organismos de manera tal que funcionan como una gran población fragmentada. Este concepto guarda relación

cercana con la Teoría de biogeografía de islas⁸; y si bien debido al carácter heterogéneo del ambiente en algunas especies se pueden reconocer fácilmente metapoblaciones naturales, en general, son los procesos de antropización que intervienen generalmente fragmentado el hábitat uno de los principales factores que permiten que las herramientas metapoblacionales, sean tan utilizadas en estudios de conservación de poblaciones naturales (Hanski y Simberloff 1977).

Uno de los aspectos fundamentales de las metapoblaciones es que entre las poblaciones locales que la conforman hay algunas que suelen actuar como fuentes, mientras que otras actúan como receptores de individuos. En general, las poblaciones locales en las que la tasa de natalidad supera la mortalidad “producen” más individuos de los que los que el parche puede soportar y por lo tanto algunos migran; mientras que en las poblaciones locales que son receptores de individuos, la mortalidad supera la natalidad. Se debe tener en cuenta que dentro de una metapoblación la categoría de fuente o receptora que puede asumir una población local no es estable pudiendo estas pasar de una a otra categoría de acuerdo a las condiciones del medio. Por otro lado, los individuos pueden migrar de cualquier población a cualquier otra, no necesariamente las migraciones son entre fuente y sumideros sino que incluso puede haber migraciones desde sumideros hacia fuentes. Esto hace que las metapoblaciones sean sistemas extremadamente dinámicos, en el que además de existir migraciones internas entre las poblaciones locales, puede haber extinciones (sin que la metapoblación desaparezca) y reapariciones de poblaciones locales. Esta dinámica metapoblacional está condicionada por la capacidad dispersiva de los individuos que la conforman, por la distancia entre los parches, y por la existencia de barreras que impidan o limiten dicho flujo (muy asociado a barreras antrópicas), por lo que es necesario la presencia de “corredores biológicos” para la persistencia en el tiempo de la misma.

Si bien existen varios modelos metapoblacionales, a los fines en este capítulo se explicará muy brevemente uno de los más sencillos, de modo que el lector adquiera los conceptos mínimos que le permitan seguir indagando en caso que crea necesario hacerlo para un estudio específico. El modelo clásico metapoblacional descrito por Levins (1969), tiene como supuestos que todos los parches son parecidos (forma y tamaño), que la tasa de desplazamientos entre parches no es muy alta ni muy baja, no contempla diferencias entre desplazamientos de individuos (poseen la misma probabilidad de colonizar), están separados por distancias similares y las interacciones entre parches son iguales. En estas condiciones, se centra en la proporción de parches ocupados, dejando de lado las dinámicas poblacionales internas (como la natalidad y la mortalidad). De esta forma, una población local puede asumir sólo 2 estados, puede existir (estar presente) o no (ya sea porque está extinta, porque el parche aún esta inhabitable, o bien, porque el parche aún no fue colonizado). De esta manera, podemos calcular la tasa de recambio, es decir, la variación en el tiempo en el número de parches ocupados de la siguiente forma:

⁸ Teoría Biogeográfica de Islas, publicada en 1967 por Robert H. MacArthur y Edward O. Wilson. La biogeografía estudia la distribución espacial de los seres vivos, los procesos que han determinado dicha distribución, así como los factores que pueden modificar esas distribuciones. La biogeografía de Islas en particular brindó a los ecólogos herramientas matemáticas para entender cómo las especies colonizan de nuevas áreas, las extinciones locales, y cómo esto se ve regulado por la coexistencia entre especies y las características del espacio natural.

$$\frac{dp}{dt} = mp(1-p) - ep$$

Donde p es la proporción de parches ocupados, $1-p$ la proporción de parches en las que no hay poblaciones locales, m la tasa de colonización de un parche; y e la tasa de extinción en un parche.

Entonces, en una metapoblación en equilibrio la tasa de recambio será cero y en esas condiciones la proporción de parches ocupados podrá ser calculada como sigue:

$$\frac{dp}{dt} = 0 \rightarrow p = 1 - \frac{e}{m}$$

De manera que:

Si $e > m$ la metapoblación tiende a desaparecer

Si $e = m$ metapoblación en equilibrio (Aunque cualquier extinción fortuita haría reducir la metapoblación)

Si $e < m$ la metapoblación tiende crecer y mantenerse en el tiempo.

Si bien la aplicación de herramientas metapoblacionales en planes de conservación está bastante difundida, en estudios específicos ecotoxicológicos, aún no se ha avanzado demasiado, siendo esto quizás uno de los principales desafíos de esta disciplina científica para los próximos años.

Bibliografía

- Mirande, V., Barreto, G. A., Halebian, S. E., y Tracanna, B. C. (2009). Biodiversidad del Parque Nacional Pre-Delta (Entre Ríos, Argentina). Estudio cuantitativo del fitoplancton. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 44, 11–23.
- Huang, Y. y Chi, H. (2011). The Age-Stage, Two-Sex Life Table with an Offspring Sex Ratio Dependent on Female Age. *Journal of Agriculture & Forestry*, 60(4), 337-345.
- Deevey, E.S. (1947). Life tables for natural populations of animals. *The Quarterly Review of Biology*, 22, 283-314.
- Rabinovich, J.E. (1978) Ecología de poblaciones animales. OEA, Washington D.C, USA.
- Schneider, M. I., Sanchez, N.E., Pineda, S., Chi, H., Ronco, A. E. (2009). Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological Approach. *Chemosphere*; 76, 1451-1455.
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52, 81-106.

- Rimoldi, F., Schneider, M.I., Ronco, A.E. (2008). Susceptibility of *Chrysoperla externa* eggs (Neuroptera: Chrysopidae) to conventional and biorational insecticides. *Environmental Entomology*, 37, 1252-1257.
- Rimoldi, F., Fogel, M., Ronco, A.E., Schneider, M.I. (2017). Comparative susceptibility of two Neotropical predators, *Eriopis connexa* and *Chrysoperla externa*, to acetamiprid and pyriproxyfen: Short and long-term effects after egg exposure. *Environmental Pollution*, 231, 1042-1050.
- Hanski, I. y Simberloff, D. (1997). The metapopulation approach, its history, conceptual domain, and application to conservation. En *Metapopulation Año XII*, N°2 / 2003 Mayo - Agosto biology: ecology, genetics, and evolution (eds. Hanski, I. y Gilpin, M.), pp. 5-26, Academic Press, San Diego, USA.

CAPÍTULO 11

Efectos sobre las comunidades biológicas

Gagneten, Ana María y Regaldo, Luciana

*Social rules can be broken, but the laws of nature can't.
Without profound respect for Nature and compassion
for life, all life, knowledge is likely to be insufficient.*
J. T. TREVORS & M. H. SAIER JR, Three Laws of Biology

En la **Sección 1** del presente capítulo, se expondrán brevemente conceptos básicos sobre el nivel de comunidad, que pueden profundizarse en textos de Ecología general y se presentarán los diferentes ensayos ecotoxicológicos disponibles, destacando sus ventajas y desventajas, haciendo hincapié en los bioensayos multiespecíficos que por su complejidad son los más apropiados para estudiar efectos al nivel comunitario. Se presentan resultados del grupo de trabajo realizados con una o dos especies, y se explicitan algunos criterios para la selección de las especies de prueba.

A continuación, en la **Sección 2** se expondrán en primer lugar los estudios de efectos sobre dos o más especies, hasta el nivel ecosistémico. Se presentarán definiciones, y ejemplos resumidos en la tabla 1, así como los tipos de bioensayos multiespecíficos, los puntos finales utilizados y aspectos a tener en cuenta a la hora de diseñar test multiespecíficos. En segundo lugar, se presentarán herramientas metodológicas mediante algunos ejemplos de experimentos realizados en este nivel de organización biológica por nuestro equipo de trabajo.

En la **Sección 3** se discutirán algunos índices que se utilizan para abordar conceptualmente la complejidad de los experimentos al nivel de comunidad, y se comentan resultados del grupo de trabajo con este nivel de organización biológica, exponiendo sus alcances y limitaciones.

Finalmente, se presentan conclusiones parciales referidas a los trabajos con zooplancton, y conclusiones más generales vinculadas a la ecotoxicología de comunidades.

Sección 1: El nivel de Comunidad biológica

Una comunidad se define como un grupo de poblaciones interactuantes en un mismo espacio y tiempo. Sin embargo, el estudio de las comunidades trasciende la simple descripción de características demográficas y de historia de vida de las poblaciones individuales. Los ecólogos de

comunidades no se limitan a describir las tasas de natalidad y mortalidad u otros rasgos de las poblaciones aisladas, sino que se focalizan en las interacciones entre estas poblaciones en los sistemas naturales.

El principal objetivo de la ecología de comunidades es describir los patrones de organización de las comunidades y explicar los procesos subyacentes que gobiernan estos patrones (Wiens, 1984 en Clements y Newman, 2002).

Las comunidades representan un nivel intermedio de complejidad en la jerarquía de la organización biológica. Se diferencian de las poblaciones y ecosistemas, pero interactúan fuertemente con estos niveles inferiores y superiores de organización (Figura 11.1). Por ejemplo, en sitios contaminados es frecuente observar la pérdida de especies sensibles y su reemplazo por especies tolerantes. Así, la presencia o ausencia de especies sensibles o tolerantes a la contaminación permite a los ecotoxicólogos de comunidades estimar el grado relativo de contaminación en campo.

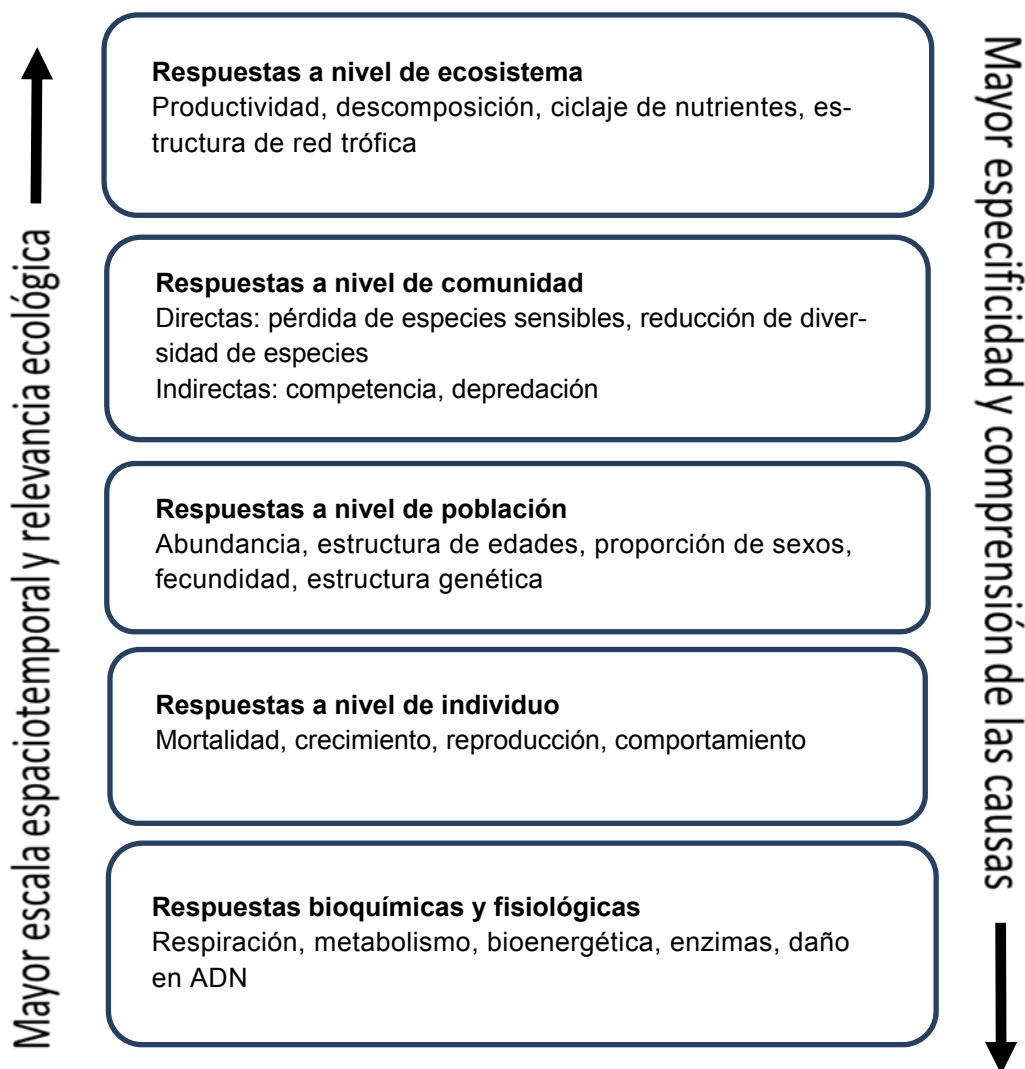


Figura 11.1: Efectos de contaminantes a través de los niveles de organización biológica. Las respuestas a niveles más bajos de organización biológica (bioquímico, fisiológico) son generalmente más específicas y mejor conocidas en términos de mecanismos subyacentes. Las respuestas a niveles más altos de organización biológica (comunidades y ecosistemas) ocurren en escalas espacio-temporales mayores y tienen más relevancia ecológica pero generalmente carecen de explicaciones mecánicas (Modificada de Clements y Newman, 2002).

Definiciones y conceptos

Una comunidad biológica se define clásicamente como "un conjunto de poblaciones de diferentes especies que viven en un área determinada o hábitat físico: es una unidad organizada en la medida en que tiene características adicionales a sus componentes individuales y poblacionales, es la parte viva del ecosistema" (Odum, 1971). Una comunidad, que habita por ejemplo un río, un campo o un bosque de ribera, está formada por especies que interactúan y forman una unidad organizada (Magurran, 1988).

Magurran (1988), sugiere el término *ensamblaje de especies* para cualquier agrupación definida operacionalmente, como por ejemplo un ensamble de especies del zooplancton, que actúan como filtradores planctónicos. Muchos modelos e índices se enmarcan en el contexto de la comunidad, pero se aplican pragmáticamente a taxocenosis o conjuntos de especies. Aunque este enfoque sigue siendo valioso y necesario, la interpretación de los resultados asociados debe ser moderada, entendiendo que un conjunto de especies, ensamble de especies o taxoceno no es la comunidad completa.

Las cualidades de la comunidad, de la metacomunidad y del ecosistema se ven afectadas por factores abióticos, incluidos los contaminantes. Desde hace ya varias décadas se estudian el destino y los efectos ecotoxicológicos de los contaminantes sobre las comunidades.

La teoría jerárquica (O'Neill et al., 1986) sostiene que los mecanismos causales que ayudan a comprender los efectos y cambios que ocurren en el nivel de organización comunitario a menudo se encuentran en el nivel inferior de organización biológica, es decir, en el nivel de población o metapoblación. Por ejemplo, el cambio puede ocurrir porque la viabilidad de una población de una especie en particular se redujo por el efecto de un tóxico sobre el crecimiento, la supervivencia o la reproducción.

Las propiedades emergentes también deben considerarse cuidadosamente en los niveles superiores de organización biológica. Las propiedades emergen en sistemas jerárquicos que no pueden predecirse únicamente a partir de nuestra comprensión limitada de las partes o componentes de un sistema. Sin embargo, a menudo subyacen procesos que no tienen una interpretación tan lineal. Por ejemplo, puede ocurrir la pérdida indirecta de varias especies porque el tóxico eliminó directamente a una especie clave importante. Una especie clave es aquella que influye en la comunidad por su actividad o función, no por su dominio numérico. Así, una especie resistente a la acción directa de un tóxico desaparecería porque otra especie que desempeña un papel crucial en la comunidad fue eliminada.

Ecotoxicología de comunidades

La ecotoxicología de comunidades es el estudio de los efectos de químicos y de agentes físicos sobre la abundancia, diversidad e interacciones de especies. Los ecotoxicólogos de

comunidades también describen los patrones en la estructura de las comunidades (por ejemplo, número y diversidad de especies, organización trófica) y los mecanismos que explican estos patrones. La ecotoxicología de comunidades se diferencia de la ecotoxicología de ecosistemas en que se centra en conocer los efectos de los contaminantes sobre la estructura de las comunidades y no en procesos ecosistémicos, tales como el flujo de energía y el ciclaje de nutrientes.

Existe una necesidad urgente de estudiar los efectos de los contaminantes sobre la biota y los procesos que sustentan la biodiversidad ambiental y los servicios del ecosistema. La posibilidad de estudiar experimentalmente los sistemas ecológicos al nivel de las comunidades permite comprender el destino del tóxico, las vías de exposición y los efectos de los contaminantes sobre las mismas. Así, el estudio de las comunidades tiene valor predictivo porque permite conocer el modo en que los contaminantes pueden afectar a los ecosistemas en su conjunto. A su vez, la investigación básica sobre redes e interacciones tróficas en ecología de comunidades ha incrementado la capacidad de interpretación y predicción acerca del transporte de contaminantes entre niveles tróficos y sobre sus efectos en la estructura trófica.

Evaluación general de efectos

Como se mencionó previamente, para evaluar los efectos a nivel de comunidad biológica, es preciso conocer los atributos poblacionales y parámetros de historia de vida de las especies que la componen.

Con el objetivo de determinar la concentración de sustancias tóxicas por debajo de las cuales la comunidad está protegida, se ha desarrollado una amplia gama de enfoques experimentales prácticos. En términos generales, una prueba de toxicidad es un intento de simulación en el laboratorio de algunas de las condiciones químicas o físicas a las que los organismos en sistemas naturales podrían estar expuestos, al menos teóricamente (Cairns y Cherry, 2009). El enfoque de especies más sensibles propone determinar cuáles son las especies más sensibles o menos tolerantes en una comunidad, como un indicador de las concentraciones a evitar, bajo el supuesto de proteger de este modo, a todas las especies de la comunidad o del ensamble de especies. A pesar de la gran ventaja de su simplicidad, surgen varias dificultades con este enfoque aparentemente aceptable (Cairns, 1986). En primer lugar, es dudosa la suposición de que las especies sobre las cuales se realizan los experimentos y los efectos medidos realmente reflejen lo más sensible de la comunidad.

Por otro lado, el supuesto de que la recopilación de los valores NOEC (*No observed effect concentration*) o LCx (*Lethal concentration*) derivados de las pruebas de laboratorio reflejarían con precisión las concentraciones nocivas para una comunidad resulta difícil de justificar (Newman et al., 2015). A menudo, los valores se derivan de las especies de prueba estándar (muy frecuentemente del hemisferio norte) y están sesgados hacia ciertos taxones. Más allá

de este sesgo hacia las especies de laboratorio y la tendencia a pasar por alto las interacciones ecológicas, es difícil saber cuántos valores de NOEC se necesitan para entender efectivamente las diferencias entre la sensibilidad de las especies en una comunidad entera o incluso en un conjunto de especies.

Estudios de efectos sobre una sola especie

Muchos autores han desarrollado técnicas y protocolos de bioensayos, utilizando a diferentes especies planctónicas (cladóceros, copépodos, rotíferos, microalgas), de vertebrados (acuáticos y terrestres) y especies vegetales (acuáticas y terrestres) como organismos test. Las modificaciones observadas en el ciclo de vida de las especies centinela pueden estar vinculadas a cambios en condiciones naturales o antrópicas. Es recomendable conocer aspectos de los ciclos de vida de los organismos en estudio a fin de no realizar extrapolaciones que pueden ser erróneas al atribuir a procesos de contaminación, cambios poblacionales que encuentran su explicación en procesos ecofisiológicos.

Los primeros criterios ecotoxicológicos para evaluar la toxicidad de los contaminantes sobre las especies acuáticas fueron la mortalidad y los daños reproductivos en ensayos cortos. Sin embargo, la necesidad de obtener información de efectos subletales a bajas dosis de contaminantes, que permita detectar el estrés previo a la muerte y tomar medidas oportunas para mitigar los riesgos, promovió nuevos enfoques metodológicos.

Estos ensayos son globalmente conocidos y aprobados, dado que se realizan siguiendo protocolos estandarizados de USEPA (1986, 2002 a, b), APHA (1998), EPA (2002 a, b y c), CEWQ (2003), OECD (2011), CEPA (2012), entre otros.

La bioconcentración y bioacumulación, es a menudo un buen indicador integrador de las exposiciones de los organismos a los contaminantes (Luoma y Rainbow, 2005). En estudios de bioconcentración utilizando Análisis de Activación Neutrónica Instrumental (AANI), el copépodo *Argyrodiaptomus falcifer* acumuló significativamente cromo (Cr) respecto al control (Gagneten et al., 2009). En estudios desarrollados por Regalado et al. (2009), *Chlorella vulgaris* acumuló significativamente más Cr que *Daphnia magna* posiblemente porque el cladócero puede detoxificar los metales acumulados en su exoesqueleto mediante ecdisis periódicas. Andreotti y Gagneten (2006), analizaron si el Cr puede quedar biodisponible desde sedimentos contaminados, afectando atributos del ciclo de vida en cladóceros nativos. Ceresoli y Gagneten (2004), encontraron efectos negativos sobre la supervivencia y fecundidad de *Ceriodaphnia dubia* con el aumento en la concentración de efluentes de curtiembre (menor número de crías/hembra, aumento del tiempo de desarrollo, retraso de la edad de primera reproducción y disminución del número de mudas). Por su parte, Gutierrez et al. (2008) ensayaron la transferencia trófica del Cr(VI) ($K_2Cr_2O_7$) con tres especies, registrando bioacumulación de este metal por parte de *D. magna* y transferencia de Cr(VI) al pez *Cnesterodon decemmaculatus* (biomagnificación).

El grupo de trabajo consideró relevante estudiar comparativamente los puntos finales de especies nativas y de *D. magna*, una especie estandarizada de distribución Holártica, dado que

permite compararla con el grado de sensibilidad de especies del litoral fluvial argentino (LFA) a los fines de aportar al conocimiento del grado de tolerancia de especies nativas, dado que, en general los niveles guía establecidos para la protección de la biota a nivel global se establecen utilizando especies estandarizadas, frecuentes en ambientes acuáticos del hemisferio norte.

En ensayos de toxicidad crónica de cobre (Cu), Cr y plomo (Pb) sobre *Moinodaphnia macleayi* y *C. dubia* (dos especies de cladóceros representativos del LFA) comparándolo con *D. magna*, se encontró que el Cu afectó significativamente distintos atributos de historia de vida de las tres especies. Bajas concentraciones de Cu y Pb no afectaron la sobrevivencia, el número de muda y la fecundidad de *D. magna* pero sí de *M. macleayi* y *C. dubia* (Regaldo et al., 2014), por lo que se destaca la importancia de utilizar como modelos biológicos, especies zooplanctónicas representativas del hemisferio sur. En otro estudio, *D. magna* manifestó menor sensibilidad que las especies nativas, siendo más tolerante al Cr y al glifosato que al Cu y al endosulfán (Gutierrez et al., 2011).

Por otro lado, ensayos de ciclo de vida que posibilitan conocer atributos integradores como la tasa neta de crecimiento poblacional (R_0) permitieron proponer niveles guía menores de Cu para la protección de biota acuática (Gagneten y Vila, 2001). Por su parte, Gagneten et al. (2014) analizaron posibles efectos del herbicida glifosato (N-fosfometilglicina) sobre parámetros poblacionales de *Ceriodaphnia reticulata* no encontrando efectos adversos sobre la sobrevivencia, pero sí sobre la fecundidad. Los valores de R_0 disminuyeron con el aumento en la concentración de glifosato, mostrando que este parámetro integrador es un buen bioindicador de toxicidad. Otro parámetro poblacional evaluado fue la tasa intrínseca (r) de crecimiento poblacional, aunque no fue tan relevante como R_0 . En otro estudio, r no fue un parámetro muy sensible a los efectos del Cr y del Cu, aunque sí al insecticida endosulfan en el cladóceros litoral *Pseudosida variabilis* (Gutierrez et al., 2011).

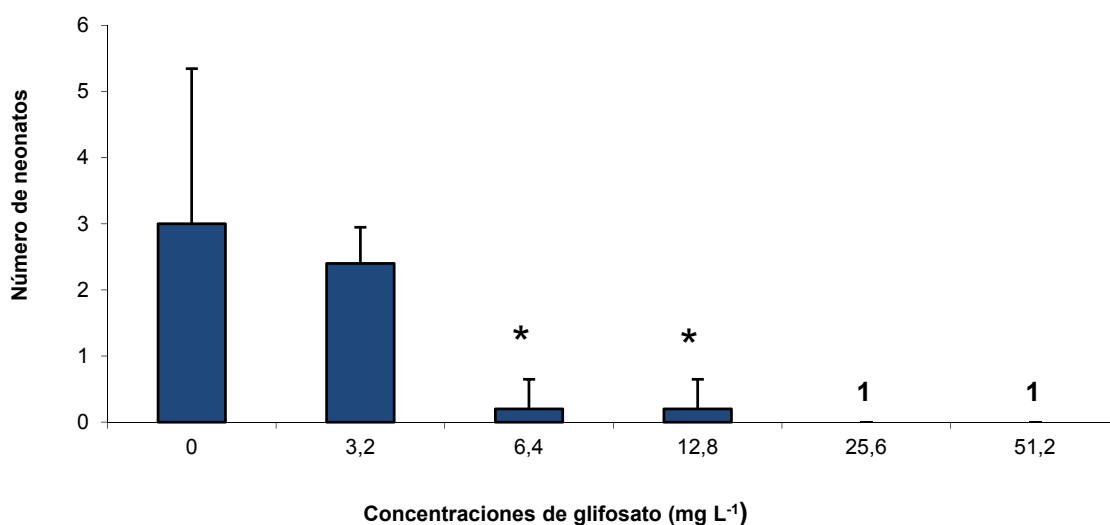


Figura 11.2: Fecundidad (N° de neonatos) de *S. vetulus* en ensayos de recuperación (15 días), luego de un período de exposición agudo (48 h) a 5 concentraciones de glifosato y el control. Las barras indican el desvío estándar (D.E.). El asterisco denota diferencias significativas con el control (ANOVA, $p < 0,05$). "1" indica la no producción de neonatos durante los 15 días del experimento.

Por su parte, Reno et al. (2015) compararon cambios en el ciclo de vida de especies planctónicas de distinto nivel trófico. Analizaron los efectos agudos de un formulado de glifosato (Es-koba®) sobre la microalga *C. vulgaris*, el cladóceros *Simocephalus vetulus* y el copépodo *Noto-diaptomus conifer*, y la capacidad de recuperación de los organismos sobrevivientes. Los puntos finales en los ensayos de recuperación fueron sobrevivencia, edad de primera reproducción y fecundidad. El orden de sensibilidad fue: *S. vetulus* (EC_{50} 48-h: 21 mg L⁻¹), *C. vulgaris* (EC_{50} 72-h: 58,59 mg L⁻¹), *N. conifer* (EC_{50} 48-h: 95 mg L⁻¹). El crecimiento de *C. vulgaris* se inhibió a las 48 h. En los experimentos post exposición, los microcrustaceos redujeron sus expectativas de vida: *S. vetulus* disminuyó su fertilidad (Figura 11.2.) y *N. conifer* no desarrolló madurez sexual en las concentraciones más altas (Figura 11.3.). En síntesis, ambas especies perdieron la capacidad de recuperarse al efecto del glifosato.

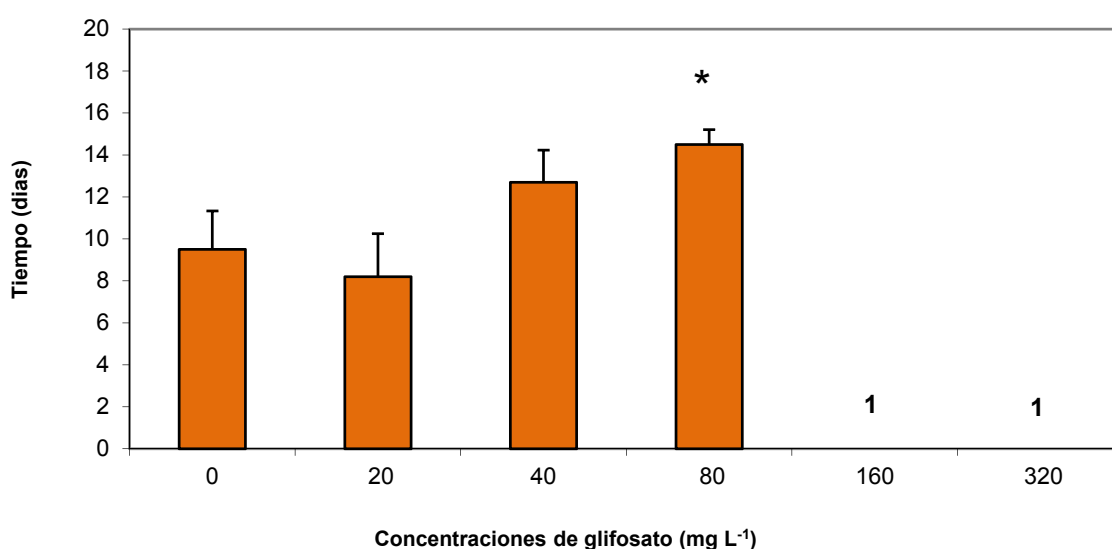


Figura 11.3: Tiempo (días) en el que *N. conifer* alcanza la madurez sexual (de copepodito 5 a 6) en ensayos de recuperación (15 días), luego de un período de exposición agudo (48 h) a 5 concentraciones de glifosato y el control. Las barras indican el D.E. El asterisco denota diferencias significativas con el control (ANOVA, $p < 0,05$). “1” indica que los organismos no alcanzaron el estado adulto, con efectos negativos sobre los organismos no blanco.

Reno et al. (2016) compararon Ro en poblaciones experimentales de *D. magna* y *C. dubia* expuestas a cuatro formulados de glifosato. También en este caso, la fecundidad fue el atributo más afectado en las dos especies. Se registraron alteraciones en el ciclo de vida por la producción de huevos abortados y efipios en *D. magna*. Ro para las dos especies de cladóceros fue <1 , condición que indicaría una disminución poblacional y posible extinción local en ambientes perturbados por los herbicidas evaluados.

Se destaca la relevancia de profundizar el conocimiento de puntos finales evaluados sobre especies nativas. Entre las especies representadas en el LFA sobre las cuales no existía información ecotoxicológica, pueden mencionarse los cladóceros *Pseudosida variabilis*, *Echinisca elegans*, *Moina micrura*, *C. reticulata*, *C. dubia* y *M. macleayi*; entre los copépodos, *Eucyclops neumani*, *Mesocyclops longisetus*, *A. falcifer* y *N. conifer*, que mostraron buenas

respuestas a contaminantes frecuentemente registrados en ambientes acuáticos continentales de Argentina y se proponen para profundizar su estudio con el objetivo de ser utilizadas en ensayos ecotoxicológicos.

Sección 2: Estudios de efectos sobre dos o más especies

Pruebas multiespecies a diferentes escalas

En los sistemas naturales, la complejidad, la superficie del área de estudio y la escala de tiempo aumentan juntos. Sin embargo, en sistemas diseñados experimentalmente, la complejidad y el tamaño pueden manipularse separadamente, logrando sistemas complejos en un tamaño razonable que permita la manipulación experimental. Entonces, es posible diseñar sistemas pequeños y complejos o sistemas grandes y simples según la pregunta que guíe la investigación, obteniendo así, resultados de la prueba de toxicidad con poder predictivo aplicable al caso ambiental en estudio.

Los ensayos multiespecies pueden ser diseñados con diferentes grados de complejidad que van desde pequeños, formados por un sistema de dos eslabones o componentes, por ejemplo, un sistema depredador-presa (Andrade et al., 2018), de transferencia trófica (Gutiérrez et al., 2008), o de comportamiento, cuantificando respuestas sutiles, para intentar conocer si un tóxico modifica las señales químicas de un depredador hacia su presa (Gutiérrez et al., 2011, Gutiérrez et al., 2012 a y b; Gutiérrez et al., 2016).

En el lado opuesto de complejidad de las pruebas multiespecie, se encuentran los ensayos a nivel ecosistémico, en los cuales se manipulan variables forzantes –por ej. el pH, la concentración de nutrientes- en relación con la carga de algún contaminante, tales como diferentes concentraciones de metales o plaguicidas, que pueden alterar todo el ecosistema, incluidas por supuesto, las comunidades biológicas.

Ensayos en estos niveles de complejidad biológica pueden tener puntos finales integrativos, por ejemplo, riqueza de especies, el grado de similitud, índices tróficos, flujo de energía, como se observa en la [Tabla 11.1](#) (según Newman, 2015).

Tabla 11.1: Variación de gradientes en el diseño y aplicación de test experimentales

<i>Complejidad de diseño</i>		
Pocos componentes	Baja Alta	Muchos componentes
Pocos puntos finales	↔	Muchos puntos finales, o puntos finales integradores
Posible de estandarizar	↔	Variación en la información de base
Replicabilidad	↔	Alta exactitud
Precisión	↔	Muy precisos
Bajo costo por unidad experimental	↔	Alto costo por unidad experimental

<i>Escala del diseño</i>		
Pequeñas unidades experimentales	Baja Alta	Unidades experimentales grandes
Receptor de bajo nivel de organización (ej. bacterias)	↔	Receptor de nivel de organización alto (ej. peces)
Receptor bajo en escala jerárquica (ej. procariontes)	↔	Receptor alto en escala jerárquica (ej. vertebrados)
Receptor bajo en redes tróficas (ej. microalgas)	↔	Receptor alto en redes tróficas (ej. Peces depredadores)
Receptor rápido en respuestas (ej. Biomarcadores)	↔	Receptor integrador de efectos de niveles más bajos (dinámica ecosistémica)
Respuesta rápida en términos del ciclo de vida del receptor	↔	Respuesta lenta en términos del ciclo de vida del receptor
<i>Diferencias en complejidad y tamaño entre bioensayos y sus aplicaciones</i>		
	Baja Alta	
Puntos finales son diferentes a los utilizados en monitoreo de sistemas naturales	↔	Puntos finales cualitativamente similares a los utilizados en monitoreo de sistemas naturales
Evaluación de riesgo, de abajo hacia arriba	↔	Evaluación de riesgo, de arriba hacia abajo
Causa conocida	↔	Efectos ambientales conocidos
Se combina un conjunto de bioensayos individuales para modelar efectos ambientales (muchas unidades experimentales)	↔	Se combina un solo test para predecir efectos ambientales (pocas unidades experimentales)
El traslado de resultados de test se traslada a predicciones de efectos ambientales (con error).	↔	Información directamente aplicable a predicciones en el sistema natural (con error).

Tipos de pruebas multiespecies

1) El **microcosmos acuático estandarizado** (SAM) es un microcosmos de 3 L diseñado para incluir muchas interacciones tróficas características de los sistemas acuáticos. Está diseñado para ser genérico, replicable e independiente del sitio de investigación, y se centra en las interacciones entre niveles tróficos (Cairns y Cherry, 1994).

2) Los ensayos de **microcosmos de tamaño mediano** incluyen sistemas artificiales en estanques y arroyos. Giddings (1986) desarrolló un microcosmos estático de 67 L que simula el área litoral de lagunas o estanques. Las comunidades que propuso incluir son: fito y zooplancton, bentos y macrófitas. Como puntos finales propuso incluir a la riqueza y similitud taxonómica, y el flujo de energía. Estas pruebas tienen un tamaño que permiten realizar un número de réplicas suficientes (al menos 3) como para que los resultados tengan validez estadística.

Se han diseñado muchos dispositivos diferentes con sistema de flujo de agua. Los diseños difieren en tamaño, patrones de flujo, profundidad, sustrato y ubicación –en el laboratorio o en el ambiente natural-. La mayoría de los sistemas medianos colocan comunidades de macroinvertebrados. Aunque potencialmente de gran utilidad, la mayoría de los diseños se han utilizado

para un solo químico por diferentes grupos de investigadores; por lo tanto, no han sido estandarizados, no son comparables en costo, consistencia o sensibilidad ni se han utilizado para evaluar varios químicos simultáneamente (Eaton et al., 1985).

3) Los **ensayos multiespecies** pueden ser **mesocosmos de estanques artificiales** del tipo utilizado actualmente en test para el registro de plaguicidas en los Estados Unidos (E.E. U.U.). Los mismos varían en tamaño, forma y sustrato y están diseñados para incluir plancton (fito y zooplancton), macrófitas, macroinvertebrados y peces como organismos de prueba. La mayoría luego son validados en experimentos en parcelas en campos agrícolas.

Son escasos los estudios **ecotoxicológicos multiespecies** que aborden el efecto de xenobióticos **sobre ensambles de especies**. Los estudios de **mesocosmos** poseen una complejidad intermedia entre los estudios de campo y de laboratorio, siendo una aproximación experimental muy útil porque permite analizar el efecto de contaminantes sobre un ensamble de especies o sobre la comunidad (y aún comparar comunidades ante igual exposición).

Los puntos finales que pueden incluirse en las pruebas multiespecies son: el destino del químico, la supervivencia de los organismos de prueba, el comportamiento, el crecimiento, la producción primaria, riqueza y diversidad del fitoplancton, la biomasa de macrófitas, así como la riqueza y diversidad de los invertebrados bentónicos, del zooplancton y de peces de pequeña talla.

Si la diversidad biótica o la eliminación de nutrientes son propiedades que se consideran valiosas en sistemas acuáticos naturales y se utilizan para juzgar el estado de salud ambiental, es válido preguntarse ¿por qué no utilizar pruebas de toxicidad que evalúen directamente los efectos del estrés por contaminación en estos atributos? Por otro lado, si se seleccionan los mismos puntos finales, será más posible la comparación de los resultados de las pruebas de laboratorio y los esperados en el sistema natural objeto de estudio.

Los experimentos de toxicidad de múltiples especies más complejos son los que involucran la manipulación experimental de ecosistemas enteros. Claramente, son los que ofrecen el mayor grado de realismo dado que no son los más cercanos a las condiciones ambientales –como los mesocosmos- sino que son el ambiente en sí mismo, sobre el que se quiere testear una o más hipótesis para obtener cierta información con fines de regulación y control.

Comparados con otras experiencias de toxicidad, son los experimentos que proveen el mayor nivel predictivo y el mayor realismo y precisión. Sin embargo, por razones éticas y prácticas, estos experimentos son raros e impracticables en la actualidad. Schindler y sus colegas han manipulado lagos enteros en el área de lagos experimentales de Canadá con nutrientes (Schindler, 1974) y ácido (Schindler et al., 1985). Llegaron a la conclusión de que la composición de organismos pequeños, de reproducción rápida y componentes muy dispersos, como el fitoplancton, puede proporcionar la mejor indicación temprana de estrés, mientras que algunos puntos finales integradores, como la producción primaria, los procesos de descomposición y el ciclaje de nutrientes, no son interrumpidos por la entrada de sustancias tóxicas.

En otro caso, el Shayler Run, un arroyo de segundo orden en Ohio, EE. UU., se dosificó con concentraciones subletales de Cu durante 33 meses (Geckler et al., 1976), realizando simultáneamente bioensayos de toxicidad. Si bien estos últimos predijeron la mortalidad de algunas especies, no predijeron que los peces evitaron el agua contaminada ni la importancia de los cambios en la calidad del agua sobre la toxicidad. Además, concentraciones seguras para algunas especies fueron subestimadas por un factor de dos.

Claramente, estudios ecotoxicológicos que involucren ecosistemas completos pueden ser realizados sin contaminar o modificar aún más el ambiente del cual se quiere conocer el efecto de algún tóxico. Por ejemplo, pueden estudiarse las comunidades planctónicas, bentónicas, de peces, de macrófitas aguas arriba, aguas abajo y en el punto de volcado de un efluente industrial (Regaldo et al., 2018). Por otro lado, los plaguicidas pueden llegar al ambiente acuático por escorrentía y/o infiltración, por el lavado de envases, por la pulverización directa sobre ríos, lagunas o arroyos e incluso por las precipitaciones (Alonso et al., 2018). Éstos fueron detectados en el agua y los sedimentos de diferentes cuencas argentinas (Aparicio et al., 2013; Primost et al., 2017; Regaldo et al., 2017; Van Opstal et al., 2017 y 2018, entre otros), pudiendo impactar negativamente en las comunidades acuáticas, entre ellas en el plancton (Reno et al., 2018; Romero et al., 2021), en ensambles de invertebrados asociados con hábitats bentónicos y con vegetación flotante (Hunt et al., 2017) y en los peces (Paracampo et al., 2015).

Sin dudas, el grado de incerteza aumenta con la escala del estudio, pero el realismo que aportan será mayor. También inevitablemente, el esfuerzo de muestreo y los costos asociados serán mayores dado que involucran series temporales más largas y un mayor número de comunidades, pero existen pruebas estadísticas que permiten manejar este nivel de complejidad y arribar a conclusiones razonablemente aceptables en términos de descripción de efectos sobre las comunidades y el sistema completo. Este tipo de información sin lugar a dudas es sumamente valiosa para los tomadores de decisiones vinculadas a la gestión ambiental.

En los E.E. U.U., la aceptación de los ensayos multiespecies es muy común en el registro de plaguicidas (por ejemplo, Touart, 1988; SETAC, 1992) y en la evaluación de productos biotecnológicos (Seidler, 1991). Ambas son aplicaciones en las que es muy valiosa la precisión predictiva, más que la comparación *per se*. La Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo no ha estandarizado aun ningún método para pruebas de especies múltiples (OCDE, 1992).

Algunos de los aspectos a tener en cuenta acerca de la utilidad de las pruebas multiespecies son la *sensibilidad*, la *relevancia*, la *estandarización* y *replicabilidad*, y la *precisión predictiva*.

Sensibilidad

Para aumentar la posibilidad de registrar datos de tolerancia en ambos extremos, es recomendable considerar y medir la mayor cantidad posible de puntos finales. El número de puntos finales muestreados y, por lo tanto, el rango de las respuestas producidas, pueden incrementarse drásticamente con las pruebas de toxicidad a nivel comunitario. Sin embargo, esto hace poca

diferencia en relación con el significado biológico de esta información. Como afirma Mount (1987): “Más sensible no significa más preciso”.

Por otro lado, las variables 'emergentes' son características de las pruebas de toxicidad multiespecies, con lo cual tendrán una mayor variabilidad de fondo (*background variability*). Sin embargo, son estas mismas variables emergentes las que con mayor frecuencia se utilizan para determinar el grado salud de los sistemas naturales. El “ruido” en este caso es a menudo un componente inevitable del aumento del realismo de la prueba.

Relevancia

Para que una evaluación de riesgo sea relevante, no sólo debe ser exacta la información sobre la concentración-respuesta al tóxico, sino que fundamentalmente, los resultados obtenidos deben ser significativos para la sociedad.

Estandarización y replicabilidad

Los ensayos multiespecies no tienen como propósito utilizar siempre las mismas comunidades. Se ha apuntado que esto puede ser un inconveniente. Sin embargo, lo relevante es precisamente la comunidad que se toma como objeto de estudio, no la replicabilidad ni la probable escasa estandarización. Muchas pruebas de especies múltiples no intentan usar la misma comunidad de organismos cada vez. Así, los resultados son bastante variables. Sin embargo, si el ensamble de organismos expuestos es lo suficientemente grande y si no son seleccionados por resistencia o sensibilidad a una sustancia química particular, entonces el rango de sensibilidades será aleatorio y, por lo tanto, altamente replicable cuando se incremente su número. Precisamente, algunos autores (Giesy, 1985) han manifestado preocupación acerca de los intentos de estandarizar estas pruebas para su inclusión en protocolos de evaluación de riesgos, argumentando que se perderá una de las principales ventajas de pruebas de especies múltiples, cual es la capacidad de modelar interacciones particulares.

Precisión predictiva

Wilson y Peter (1988) en su libro *Biodiversidad* estima que el número total de especies en la Tierra es de 50 millones. Las estimaciones más conservadoras ahora varían entre de 20 a 30 millones.

Obviamente, es imposible evaluar un pequeño porcentaje de las especies actuales ni siquiera en una determinada ecorregión o ecosistema para una variedad de sustancias químicas. Así, se hace necesario extrapolar, a partir de un número muy limitado de especies (menos de 30, comúnmente utilizadas en pruebas de toxicidad de agua dulce en E.E. U.U.) a un gran número de especies presentes en el sistema en estudio. Si bien es difícil la extrapolación entre especies (es decir, en un mismo nivel de organización biológica), más lo será del nivel de especie a comunidades, ecosistemas o paisajes.

Algunos ejemplos de ensayos a nivel de comunidad biológica

¿Cuál es la mejor escala que puedo elegir para responder mi pregunta?

A continuación, se describirán algunos experimentos desarrollados por el grupo de trabajo con organismos del plancton, aunque en algunos casos también se comentarán experiencias más complejas que incluyeron otras comunidades que, según lo mencionado previamente, tienen mayor grado de realismo y poder predictivo que las pruebas monoespecíficas.

Escalas para evaluar la estructura de la comunidad

Los cambios en la estructura de la comunidad pueden ser estudiados en distintas escalas: microcosmos (en laboratorio), mesocosmos (generalmente ubicados en el ambiente natural) o en el campo. Estas escalas incluyen el estudio de interacciones entre pocas especies hasta las que estudian exposiciones de todo el ecosistema.

Los experimentos de laboratorio tienen muchas ventajas, que incluyen la posibilidad de asignar tratamientos en forma aleatoria, contar con suficientes réplicas de cada tratamiento, mayor control de factores potencialmente distractores y mayor control sobre la dosis de exposición. Sin embargo, éstos tienen menor realismo, vinculado generalmente a la menor capacidad para explicar procesos que ocurren a escalas espaciales y temporales mayores (Newman y Clements, 2008).

Efecto de los contaminantes sobre la comunidad del plancton de agua dulce

Comunidad zooplanctónica y su valor como bioindicador

La comunidad zooplanctónica está integrada por pequeños invertebrados acuáticos representados mayoritariamente por rotíferos, cladóceros y copépodos, y constituyen la base de las tramas tróficas de ecosistemas acuáticos por alimentarse mayoritariamente de microalgas y material particulado, constituyendo la dieta de peces zooplanctófagos de pequeña talla y de larvas y juveniles de peces de mayor talla. Contribuyen al ciclado de los nutrientes y a disminuir la eutrofización de ecosistemas acuáticos.

Según los estudios seminales de José de Paggi (1990, 2004a; 2004b), al menos 502 especies fueron estimadas en el río Paraná y su llanura de inundación. Algunas de estas especies fueron seleccionadas por nuestro grupo de trabajo para evaluar efectos de diferentes contaminantes en estudios de laboratorio, mesocosmos y campo.

Los **mesocosmos**, son sistemas experimentales relativamente grandes diseñados para representar alguna comunidad clave de un ecosistema. Generalmente están expuestos a las condiciones naturales y se ubican lo más cercanamente posible al ecosistema que se quiere representar, en algunos casos en el mismo ambiente, aunque en otros casos pueden realizarse en el laboratorio. Desde hace algunos años se discute cuál es el volumen mínimo requerido para un mesocosmos. Dada la gran disparidad en la bibliografía en relación con esta temática, se concluye que más que el volumen en sí, para definir esta escala de estudio es preciso alcanzar un cierto grado de complejidad, que puede estar dada por el número de especies o ensambles de especies, niveles tróficos involucrados, hábitos de vida, tipos de ciclos de vida y modos de reproducción, etc. En este sentido, es relevante considerar la complejidad del sistema (número de organismos/comunidades interactuantes) y que el volumen guarde relación con el tamaño de los modelos biológicos evaluados.

Los **mesocosmos** son útiles para confirmar efectos de exposición, efectos crónicos, interacciones de depredador y presa, y cambios en las poblaciones y comunidades. Asimismo, permiten analizar el efecto de distintos contaminantes sobre el crecimiento, la reproducción, distintos aspectos de la historia de vida de los organismos, cambios en el comportamiento, malformaciones, así como la capacidad de bioacumulación y eliminación de metales u otros contaminantes. También permiten comparar las respuestas de dos o más comunidades, con un grado de complejidad razonable y manejable en términos de costos e inversión de tiempo. (Calow, 1998). Anon et al. (1991), resumen procedimientos para realizar experiencias de mesocosmos para evaluar efectos de plaguicidas en agua dulce.

Difieren de los **microcosmos** en que son de mayor tamaño y tienen un menor grado de control por parte del investigador. Aunque los mesocosmos tienen diseños muy variables (Ej. Figura 11.5. y Figura 11.9.), todos tienen en común el objetivo de lograr mayor realismo del que permiten los microcosmos y mayor control que el posible en los estudios de campo, a nivel ecosistémico.

Liber et al. (1992) realizó un estudio de mesocosmos para estudiar las respuestas de la comunidad zooplanctónica a la aplicación de un policlorofenol (2,3,4,6-tetraclorofenol) colocando bolsas plásticas *in situ*, desde los sedimentos hasta la superficie de un curso de agua dulce. El diseño experimental permitió evaluar diferentes concentraciones del tóxico y réplicas entre tratamientos.

Gagneten (2002) evaluó el impacto del Cr total y Cr(VI), muy utilizado en la pampa argentina en industrias de curtiembres, sobre la estructura del zooplancton del río Paraná durante 35 días, con un período de aclimatación previo de un mes y medio (total 80 días). Se utilizaron mesocosmos de PVC de 150 L al aire libre. Se evaluó diversidad, riqueza de especies y densidad del zooplancton, así como la capacidad de repoblamiento. El Cr tuvo un importante efecto negativo sobre esta comunidad. La densidad disminuyó significativamente con el incremento en la concentración de Cr, así como la riqueza de especies y diversidad específica. El repoblamiento sólo ocurrió en el tanque con la concentración menor. En todos los tratamientos se registró una importante recuperación de las larvas nauplios luego de cada aplicación del contaminante las que, junto con una especie de rotífero, mostraron ser más tolerantes que cladóceros y copépodos

adultos. Es decir, cambió la estructura de tamaño de la comunidad por disminución de los organismos de mayor talla determinando una simplificación de la red trófica con la dominancia de *r* estrategias. Esto coincide con lo comunicado por otros autores (Havens, 1994; José de Paggi, 1997; Hanazato, 1998;) quienes determinaron que la contaminación con plaguicidas produjo la dominancia de organismos de pequeño tamaño en la comunidad zooplanctónica.

La escala de mesocosmos también permite comparar comunidades ante igual exposición. En línea con este enfoque, Gagneten y Marchese (2003) estudiaron el efecto de del herbicida Paraquat sobre ensambles de zooplancton y zoobentos y la capacidad de recuperación. El herbicida provocó disminución de la abundancia y biomasa de los individuos más grandes (cladóceros, copépodos adultos y moluscos) y el ensamble de zoobentos requirió mayor tiempo de recuperación por sus ciclos de vida más largos. A diferencia del bentos, la riqueza de especies del zooplancton fue menos afectada que su densidad. El estudio mostró que concentraciones ambientalmente relevantes –es decir, las que pueden encontrarse en el ambiente- de Paraquat son perjudiciales para dos comunidades clave de ecosistemas de agua dulce.

A continuación, se presentarán con mayor extensión, tres ejemplos de mesocosmos realizados por el grupo de trabajo, comparando dos o más comunidades. En el primero (A) se estudiaron los efectos de un metal (Cr), en el segundo (B), de un herbicida (glifosato) y en el tercero (C) de dos herbicidas (glifosato y cipermetrina) aislados y en mezcla.

Ejemplo A: Marchese et al. (2008) estudiaron la acumulación y eliminación de Cr por especies de distinto nivel trófico: la planta sumergida *Ceratophyllum demersum* (Ceratophyllaceae), el oligoqueto *Limnodrilus udekemianus* (Tubificidae), el cangrejo *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda) y el pez *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae), con sedimento artificial (130 kg: arena, caolinita y turba, según OECD, 2004), enriquecido con Cr(VI) y 800 L de agua, durante 28 días, seguidos de 7 días sin Cr(VI) para evaluar la concentración residual.

Las concentraciones nominales fueron 3 mg L⁻¹ Cr(VI) (tratamiento 1, T1) y 6 mg L⁻¹ Cr(VI) (tratamiento 2, T2), y un control (T0) en idénticas condiciones, sin Cr, todos duplicados. En cada tanque a los 0, 1, 14 y 28 días, se tomaron muestras de agua (1 L), sedimentos (250 g), macrófitas (10 g), oligoquetos (2–3 g), branquias de cangrejos (2-3 organismos) y peces (pool de 10 especímenes) durante la fase de acumulación y a los días 1 y 7, durante la fase de eliminación. La concentración de Cr aumentó rápidamente alcanzando los valores más altos entre 7 y 14 días de exposición. El Cr se acumuló significativamente ($p < 0,05$) en los tejidos de las cuatro especies en relación al control. El orden de bioconcentración fue: *C. demersum*: 718,66 ($\pm 272,91$) > *L. udekemianus*: 172,55 ($\pm 80,8$) > *Z. collastinensis*: 67,72 ($\pm 35,4$) > *C. decemmaculatus*: 23,11 ($\pm 12,82$), es decir, mayor en la planta y oligoquetos que en los cangrejos y peces (Figura 11.4.). La fase de eliminación de 7 días fue suficiente para obtener una reducción significativa de Cr en *C. decemmaculatus*, pero no en *C. demersum*, *L. udekemianus* y *Z. collastinensis* (Marchese et al., 2008).

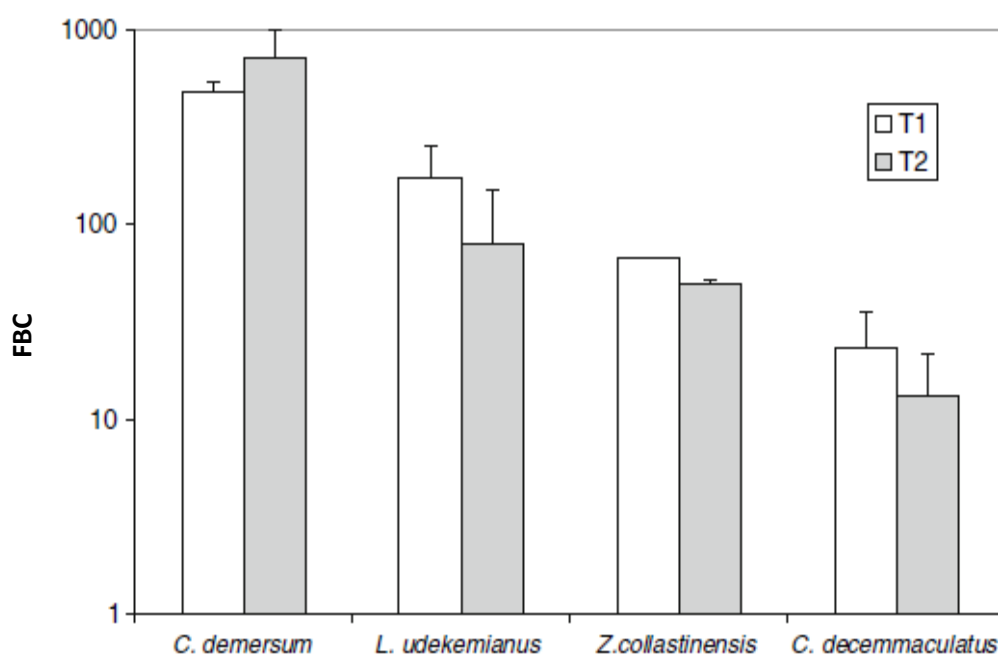


Figura 11.4: Factor de Bioconcentración (FB) (Cr tejido/Cr agua) a 28 días de exposición. Las barras indican D.E. T1: tratamiento 1 (3 mg L⁻¹); T2: tratamiento 2 (6 mg L⁻¹).

Se concluye que todos los taxa evaluados en este estudio acumularon Cr y podrían ser propuestos como bio-monitores de contaminación en ambientes dulceacuícolas, dado que, si el metal está en los tejidos, refleja la biodisponibilidad en el ambiente.

Ejemplo B: Andade et al. (2019), determinaron experimentalmente los efectos directos e indirectos de un formulado de glifosato sobre la estructura y dinámica del plancton (fito y zooplancton) considerando distintos atributos comunitarios, en mesocosmos de 600 L al aire libre, durante 7 días considerando un control y dos concentraciones de glifosato. C1: 6,2 mg L⁻¹ y C2: 12,7 mg L⁻¹, con toma de muestras al inicio (T0) y a las 8 h (T1), 32 h (T2), 56 h (T3) y 80 h (T4) (Figura 11.5.).

El glifosato redujo significativamente la abundancia de cladóceros y aumentó significativamente las abundancias de rotíferos, Chlorophyceae y Euglenophyceae. La diversidad de tallas del zooplancton se redujo (Figura 11.6.), igual que la equitabilidad de microalgas. Se encontró correlación negativa y significativa entre la concentración de glifosato y la abundancia de Cladocera ($r=-0,59$; $p=0,001$) y Copepoda ($r=-0,88$; $p=0,0001$).



Figura 11.5: Mesocosmos de 600 L empleados para evaluar los efectos de dos concentraciones de glifosato sobre el plancton (fito y zooplancton).

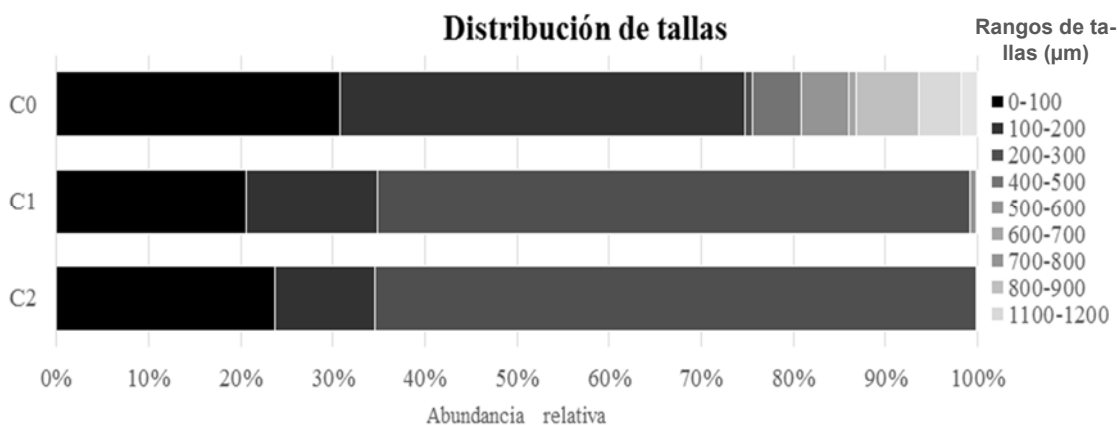


Figura 11.6: Distribución relativa de la abundancia de zooplancton en clases de tallas en C0 (control) y dos concentraciones de glifosato al final del experimento.

Los rotíferos *Asplanchna* sp., *Brachionus calyciflorus* y *Brachionus angularis* aumentaron significativamente en las dos concentraciones de glifosato respecto al control (Figura 11.7). Las modificaciones en la estructura de tallas del zooplancton pueden afectar al fitoplancton (Figura 11.8), siendo toda la comunidad planctónica un buen indicador de efectos de herbicidas. El uso de métricas combinadas del plancton es un enfoque apropiado para evaluar efectos directos e indirectos del glifosato. Los componentes del plancton mostraron diferentes grados de tolerancia y competitividad más que respuestas individuales, lo que hace a la dinámica de esta comunidad un buen indicador de perturbaciones ambientales.

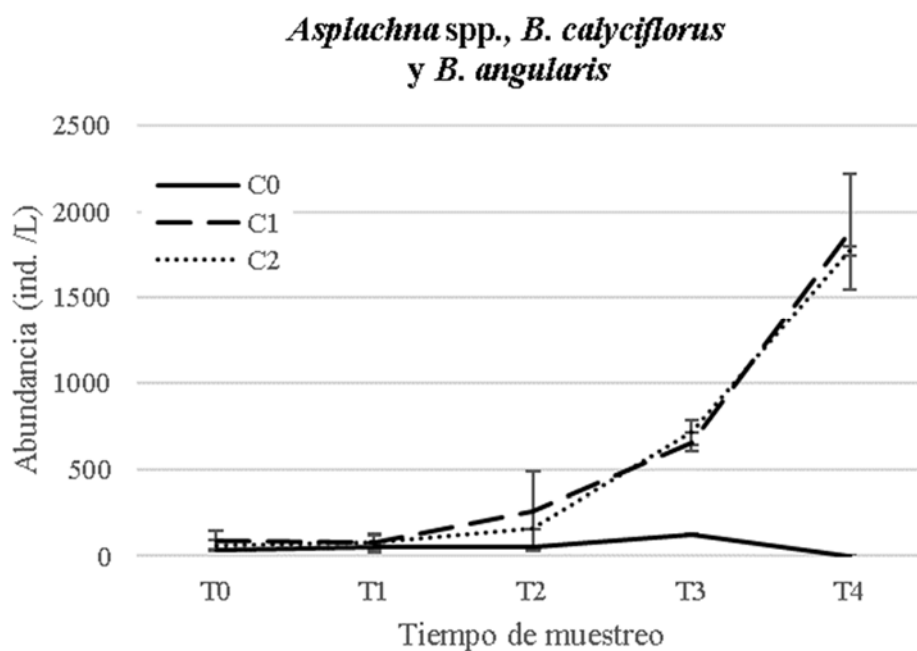


Figura 11.7: Abundancia de *Asplachna* spp., *B. calyciflorus* y *B. angularis* (agrupados) en C0: control, y dos concentraciones de glifosato (C1 y C2), en los tiempos de muestreo T0, T1, T2, T3 y T4. Las barras indican el D.E.

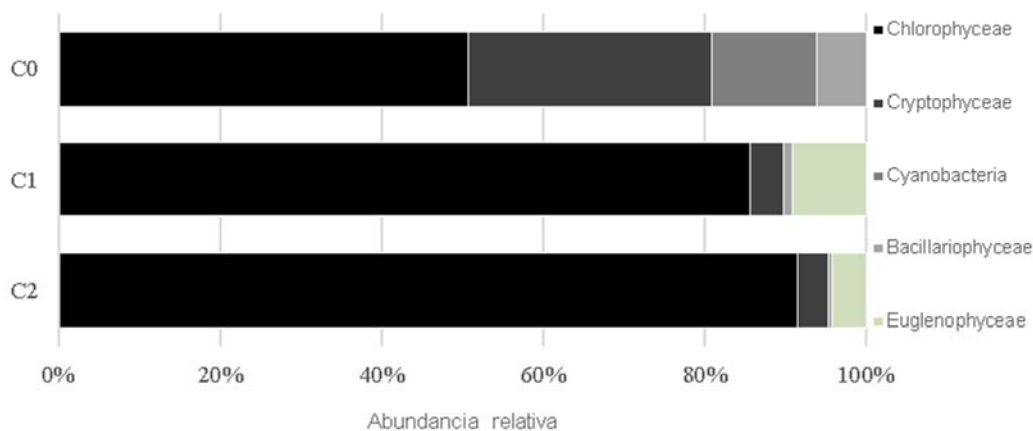


Figura 11.8: Distribución relativa de abundancia de microalgas en Clases en C0 (control), y dos concentraciones de glifosato al final del experimento.

Ejemplo C: Andrade et al. (2021) realizaron mesocosmos (30 L) en el Laboratorio de Ecotoxicología (FHUC, UNL), exponiendo durante 7 días un ensamble zooplanctónico del río Paraná Medio a cipermetrina, glifosato y la mezcla de ambos plaguicidas, más un control, todos por triplicado para evaluar posibles efectos sinérgicos o antagónicos (Figura 11.9). La diversidad y riqueza de copépodos y cladóceros fueron significativamente menores al control en los tratamientos con cipermetrina y la mezcla a los 3 y 6 días (ANOVA $p < 0,05$). La abundancia de cladóceros fue significativamente menor al control en los tratamientos con cipermetrina y la mezcla a los 3 días (ANOVA $F=9,42$ $P=0,002$). A los 6 días no hubo supervivencia de cladóceros en los tratamientos con cipermetrina y la mezcla. La abundancia de copépodos fue significativamente menor al control en los

tratamientos con cipermetrina y la mezcla a los 3 y 6 días (ANOVA $F=47,95$ $p<0,0001$ y $F=19,42$ $P<0,0001$). La composición del ensamble de microcrustáceos fue significativamente diferente entre tratamientos a los 3 y 6 días (NPMANOVA $F=3,01$ $p=0,002$ y $F=3,35$ $P=0,005$). Los nauplios y los copépodos ciclopoideos explicaron el 50% de tales diferencias (SIMPER). La abundancia de rotíferos tendió a aumentar en los tratamientos con cipermetrina y la mezcla (ANOVA $p>0,05$). La mezcla de plaguicidas produjo una disminución de la abundancia de copépodos en el tiempo (100%) mayor a la suma de los efectos de los plaguicidas individuales (97%). En los cladóceros no se pudo observar el efecto de la mezcla a los 6 días debido a que la concentración aplicada de cipermetrina, tanto aislada como en mezcla, produjo el 100 % de su mortalidad. Sin embargo, cuando se analizó este efecto en un escenario de menor exposición en el tiempo, a los 3 días, se observó que la mezcla de plaguicidas produjo una disminución de la abundancia de cladóceros respecto al control (100%) mayor a la suma de los efectos de los plaguicidas individuales (85%). La mezcla de plaguicidas produjo un incremento de la abundancia de rotíferos respecto al control (316%) mayor a la suma de los efectos de los plaguicidas individuales (214%). Se concluyó que la cipermetrina sola o en mezcla con glifosato afectó negativamente al ensamble. Los plaguicidas en mezcla tuvieron un efecto sinérgico negativo sobre la abundancia de copépodos y cladóceros y un efecto sinérgico positivo sobre la abundancia de rotíferos, con disminución de tallas, lo cual denota un mayor deterioro del ensamble zooplanctónico.



Figura 11.9: Mesocosmos de 30 L para evaluar los efectos de glifosato y cipermetrina aislados y en mezcla sobre el plancton.

Como se desprende de los resultados obtenidos en los estudios de **mesocosmos** anteriormente expuestos, tanto los metales como los plaguicidas ensayados podrían generar desequilibrios importantes en los sistemas acuáticos de los cuales se obtuvieron las comunidades de ensayo (principalmente de los sistemas de los ríos Paraná y Salado), que dan cuenta del potencial del zooplancton como bioindicador de contaminación.

Asociación de especies indicadoras: Ejemplos de estudios de la comunidad zooplanctónica en ambientes acuáticos de la provincia de Santa Fe

Como fue mencionado previamente, las ventajas de simplicidad y posibilidades de manipulación independiente de variables, permiten estudiar los efectos de xenobióticos en laboratorio bajo el supuesto de que los resultados serán lo más extrapolables posible a las condiciones imperantes en el ambiente. Sin embargo, el estudio de comunidades directamente en el ambiente natural, la generación de índices y la comparación de atributos poblacionales y parámetros comunitarios con sitios menos contaminados o seleccionados como controles, a la vez que se establecen correlaciones con datos fisicoquímicos y el monitoreo simultáneo de concentraciones de contaminantes, permite conocer cuáles son las mejores especies indicadoras de estrés ambiental.

El diseño de micro y mesocosmos, entonces, utilizando estas especies permitiría a su vez establecer generalizaciones sobre las condiciones ambientales. Alternativamente, si se trata de especies tolerantes a la contaminación, la teoría ecofisiológica predice que, si se exponen experimentalmente a contaminantes, tendrán un mejor desempeño (*fitness*) que las especies menos tolerantes, lo cual abre interesantes posibilidades para testear experimentalmente hipótesis contrastantes utilizando especies tolerantes. Ahora bien, ¿cómo conocer cuáles son las especies más tolerantes en los sistemas naturales? Una aproximación experimental válida es vincular resultados de biomonitoreo y monitoreo fisicoquímico en los propios ecosistemas.

Veamos algunos ejemplos:

1) Por el efecto de la urbanización en una laguna urbana del sistema del río Paraná (laguna Setúbal) se registró abundancia de protozoos (*Dexiostoma campylum*, *Didinium nasutum*, *Plagyopila* y rotíferos Bdelloidea tales como *Philodina* sp. y *Rotaria* sp.) en los sitios de recepción de desagües pluviales; mientras que los rotíferos Monogononta (*Platyias quadricornis*, *Mytilina ventralis* y *Lepadella ovalis* y el cladóceros *Chydorus pubescens* fueron dominantes en el sitio de referencia (José de Paggi et al., 2008). En el mismo sistema, la concentración de nitratos, amonio, calcio, sulfato y potasio indicaron tres órdenes de magnitud mayores a cuerpos de agua no contaminados de la región (Maine et al., 1999). Los autores concluyeron que el impacto de la urbanización se vio reflejado tanto en la química del agua como en la composición del zooplancton.

2) En el sistema del río Salado en su tramo inferior Gagneten y Ceresoli (2004) y Gagneten et al. (2007), registraron metales (Cr, Cu, Pb) y sulfuro, provenientes de efluentes industriales y urbanos puntuales y difusos en agua y sedimentos de fondo, en concentraciones mayores a los

estándares permitidos. Los valores de materia orgánica, oxígeno disuelto (OD), nitritos, nitratos y sulfuro indicarían la confluencia de procesos de eutrofización y contaminación del sistema.

Al relacionar datos químicos y biológicos, la densidad de zooplancton presentó correlaciones negativas y significativas con la concentración de Cr y sulfuro, donde los cladóceros fueron los organismos menos tolerantes (o más sensibles). La densidad total del zooplancton fue significativamente mayor en el río que en los canales y arroyos de la cuenca del río Salado en su tramo inferior, con dominancia de rotíferos, pero mayor biomasa de cladóceros. Entre los copépodos, Calanoida dominó sobre Cyclopoida y Harpacticoida. Correlaciones negativas se encontraron entre la biomasa de copépodos y las concentraciones de Cu y Pb (Gagneten y Paggi, 2009). La riqueza y diversidad de especies fueron buenos indicadores de estrés ambiental, siendo los rotíferos los más tolerantes a metales, seguidos por los copépodos y los cladóceros.

La alta conductividad registrada en el río Salado (media $5.965 \mu\text{S cm}^{-1}$) también podría ser causa de la proliferación de algunas especies de rotíferos tolerantes, tales como los géneros *Hexarthra*, *Brachionus* y *Lecane*, representados por numerosas especies. La biomasa absoluta decreció en el orden Copepoda>Cladocera>Rotifera. Las concentraciones de Cr del río Salado inferior (Gagneten et al., 2007) fueron muy superiores a los anteriormente registrados por Villar et al. (1998) en el río Paraná medio e inferior. Cataldo et al. (2001) registraron entre 3,16 y $4,97 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr en aguas superficiales y entre 27,90 y $59,90 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr en agua intersticial del delta del río Paraná. Por su parte, Gagneten y Ceresoli (2004) registraron hasta $215 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr en aguas del arroyo Las Prusianas que desemboca en el río Salado, es decir, concentraciones de Cr entre uno y dos órdenes de magnitud superiores a las del río Paraná medio.

La densidad total presentó una relación positiva con el OD y con el mesozooplancton pero no con el microzooplancton lo que indica que el microzooplancton sería más tolerante a la deficiencia de OD que la fracción mayor. Por otro lado, Gagneten y Paggi (2009) señalan que la biomasa zooplanctónica fue mucho menor en comparación con sistemas menos contaminados de la región. Este patrón es contrario a lo registrado para la densidad, lo que estuvo vinculado al establecimiento y proliferación de especies de pequeña talla (rotíferos). Se encontraron correlaciones negativas entre la biomasa de copépodos y las concentraciones de Cu y Pb en sedimentos y entre densidad de rotíferos y las concentraciones de Cr en sedimentos.

Esto indica que esta línea de evidencias (declinación en la biomasa del zooplancton a mayor concentración de metales) también es un buen indicador de sistemas acuáticos contaminados con metales. A partir de los resultados anteriormente mencionados, los autores determinaron tres grupos de ambientes en la cuenca del río Salado inferior: el cauce principal del río, con menor contaminación y mayor densidad, riqueza y diversidad de zooplancton, y abundancia de cladóceros, que se separó claramente de los otros dos grupos de cursos de agua, principalmente canales y arroyos donde abundaron especies r estrategias de escasa biomasa y unas pocas especies tolerantes, tales como *Eucyclops neumani*. (Gagneten, 2011) resume los patrones encontrados: una relación inversa entre condiciones de estrés y tamaño corporal con proliferación de especies r estrategias (rotíferos) y especies oportunistas (larvas

nauplio), dominancia de especies tolerantes y disminución de las más sensibles (copépodos y cladóceros).

Por otra parte, más recientemente Regalado et al. (2017) analizaron comparativamente variaciones temporales de la estructura de la comunidad zooplanctónica del Sistema de Arroyos Colastiné-Corralito (Santa Fe, Argentina) con concentraciones de plaguicidas (Atrazina -Atr- y Endosulfán -End-) y microcontaminantes inorgánicos (Cr, Cu, Pb y As) registrados en agua y sedimentos. Los valores de Cr, Pb y Cu registrados en agua superaron ampliamente los niveles guía propuestos para la protección de la biota acuática (el Cr los superó en 137 y 143 veces; el Pb 87 y 97 veces y el Cu 35 veces). La concentración de Atr en agua fue mayor que la de End, aunque nunca sobrepasó los niveles guía, mientras que el 70,83% de las muestras en donde se registró End si los superó. En agua, el 97,91 % de las muestras con Cr superaron los niveles guía para la protección de la vida acuática, el Cu lo hizo en un 70,83%, mientras que el Pb y el As en un 97,91 y 43,75%, respectivamente. En sedimento, un 2,08%, 4,16%, 39,58% y 14,58% de las muestras sobrepasaron los niveles guía para el Cr, Cu, Pb y As. La dominancia de los diferentes grupos fue Rotifera>Copepoda>Cladocera. De manera similar a los trabajos anteriores, este último grupo mostró mayor sensibilidad a las variaciones de calidad del sistema. Cuando las concentraciones de metales registradas en agua fueron máximas, la riqueza y abundancia de rotíferos y cladóceros se vio afectada. A su vez, valores extremos de conductividad, pH y la carga de contaminantes orgánicos posiblemente afectaron la estructura de la comunidad zooplanctónica (Menegazzo et al., 2016).

Sección 3: Índices aplicados en el nivel de comunidad biológica

Existen múltiples estrategias para abordar problemáticas relacionadas con la contaminación de los ecosistemas que, aplicadas de manera integrada, brindan información acerca del estado de salud o deterioro ambiental. Entre ellas podemos destacar: la determinación de parámetros fisicoquímicos y bioquímicos, la detección de bioindicadores de contaminación y la aplicación de índices. Éstos últimos han adquirido relevancia en los últimos años, dada su capacidad de generar una imagen sintética de las condiciones ambientales en el territorio.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que:

- En ecosistemas complejos, no es fácil distinguir los efectos del enriquecimiento orgánico de los efectos de la contaminación, a través de la estructura de las comunidades analizadas.
- Es importante conocer los requerimientos ecológicos de las especies dominantes en los ensambles estudiados para poder delimitar las áreas de mayor perturbación.
- Es fundamental tener un análisis del sistema y no sólo de un área reducida porque las posibilidades de hacer un diagnóstico y dar recomendaciones erróneas en el último caso, aumentan. Al respecto, en ríos con llanura de inundación es necesario tener en cuenta no sólo el cauce principal sino también el área inundable (Marchese et al., 2008a) ya que debido a la dinámica hidrosedimentológica se produce redistribución de sedimentos desde el cauce principal al área inundable y viceversa (Marchese et al., 2020).

Se describen a continuación algunos ejemplos de los índices seleccionados en los estudios previamente descriptos en la Sección 2.

Además de los índices que se aplican para estudiar la calidad del agua y de los sedimentos (CCME 2001), se encuentran disponibles diversos índices para determinar la integridad ecológica de sistemas acuáticos en relación con la estructura de las comunidades biológicas (Gallardo et al., 2011). Sin embargo, su utilidad varía considerablemente dependiendo de los parámetros medidos; la información que proveen dependerá de las condiciones ambientales, dificultando así la selección de los índices más apropiados para biomonitoreos de cuencas hidrográficas y la comparación entre diferentes sistemas.

Las mediciones tradicionalmente aplicadas en el análisis de los cambios estructurales de la taxocenosis como consecuencia del impacto antrópico, son el *Índice de Margalef* (1958) (Ludwig y Reynolds, 1988), conocido también como de *Riqueza de especies* “R” (se refiere al número de especies presentes en una comunidad) y el *Índice de Diversidad de Shannon-Wiener* “H” (Shannon y Weaver, 1949); este último es probablemente el más empleado en ecología de comunidades, aunque también se emplean otros tales como la diversidad funcional y diversidad taxonómica.

Otros atributos de las comunidades que pueden ser empleados en el monitoreo de la calidad ambiental son la “*Equitabilidad*” que se refiere a cuán equitativa es la distribución de los individuos entre las especies que conforman una comunidad, y la “*Dominancia*”, ambos indican variaciones en la distribución del número de organismos en función de los taxa existentes en una muestra (Begon et al., 1988).

Estos índices se calculan mediante las siguientes fórmulas (Colwell, 2009):

- **Riqueza de especies: “R”, o “S”:** Número de especies que se encuentran en un hábitat, ecosistema, área o región determinada.

$$R = \frac{S - 1}{\ln(n)}$$

Donde:

S= número total de especies

n= número total de individuos observados

- **Diversidad de especies: Shannon-Wiener “H”,** el índice contempla la cantidad de especies presentes en el área de estudio (*riqueza de especies*) y la cantidad relativa de individuos de cada una de esas especies (*abundancia*).

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i \cdot \ln P_i$$

Donde:

S= Número de especies

P_i= Proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos

- **Equitabilidad “E”**, es el grado en el que las diferentes especies son similares en cuanto a su abundancia. Así una comunidad con cuatro especies tendrá una riqueza de S=4 y si todas tienen una abundancia relativa del 25% la equitatividad será del 100%. Puede cuantificarse expresando la diversidad específica (H) como una proporción del valor máximo de H si todos los individuos estuvieran uniformemente distribuidos entre las especies (Begon et al., 1988). Varía de 0 a 1; el valor “1” indica que todas las especies son igualmente abundantes. Se representa con la siguiente fórmula:

$$J = \frac{H}{H_{\max}} = \frac{\sum_{i=1}^S P_i \cdot \ln P_i}{\ln S}$$

Donde:

H= Índice de Shannon- Wiener

H máx.= Diversidad máxima que se obtendría si la distribución de las abundancias de las especies en la comunidad fuese perfectamente equitativa.

- **Dominancia**, es lo contrario a equitabilidad. Por ejemplo, si tres especies están presentes en dos comunidades compuestas por 500 individuos. En la primera comunidad, 450, 41 y 9 individuos pertenecen a las especies A, B y C, respectivamente. En la segunda comunidad, el número de individuos en las comunidades A, B y C son 134, 138 y 228 respectivamente, los individuos están más equitativamente distribuidos –o hay menor *dominancia*- entre especies en la segunda comunidad de especies (a veces conocida como grado de heterogeneidad) que se refleja en los índices de diversidad.

Otro de los índices aplicados a comunidades acuáticas, es el *Índice Sapróbico* (SI) de Pantle y Buck (1955). Éste utiliza la composición de especies, la abundancia relativa y la frecuencia de aparición de los diferentes taxa como indicadores del estado de degradación ambiental.

- **Índice Sapróbico (SI)**, uno de los índices bióticos más aplicados a nivel global es el índice de Pantle y Buck (1955). Los autores consideraron el sistema sapróbico de Kolwitz y Marsson (1908) y le adicionaron el concepto de abundancia relativa de los organismos de una muestra. El grado de saprobiedad en los ecosistemas acuáticos, está relacionado con la degradación de la materia orgánica, por la presencia de organismos saprófitos. Se representa con la siguiente fórmula:

$$SI = \sum s \times h / \sum h$$

Donde:

S= es el valor de saprobicidad

h= es la abundancia relativa (h= 1,3 o 5 si el taxón se encuentra en forma accidental, frecuente o abundante respectivamente).

A su vez, pueden compararse utilizando Modelos Aditivos Generalizados (GAM, por sus siglas en inglés). Además, se realizan regresiones entre los índices y variables ambientales para determinar qué factores ambientales se relacionan (positiva o negativamente) con los indicadores de biodiversidad en una determinada cuenca.

En los últimos años han emergido dos índices multimétricos para el biomonitoreo de ríos: El IBI y el ROVPACS (*River Invertebrate Prediction And Classification System*). Incluyen métricas biológicas tales como la riqueza de especies, o la abundancia de grupos funcionales tróficos. Estos enfoques se basan en: 1) la definición de puntos finales biológicos para precisar la salud ambiental; 2) la definición de sitios menos contaminados en términos comparativos; 3) métodos de muestreo, laboratorio y analíticos estandarizados; 4) ranqueo numérico de los sitios según su condición y 5) políticas ambientales rigurosas de control. Tales medidas proveen mejor información sobre las dimensiones biológicas que los monitoreos físicos o químicos.

- **RIVPACS** (*River Invertebrate Prediction and Classification System*), es un sistema de biomonitoreo acuático para determinar calidad de agua de ríos en Inglaterra. Se basa en la cantidad de taxones de macroinvertebrados que se registran durante el muestreo. Se basa en que las especies más sensibles se encontrarán en menor proporción en sitios contaminados, o con bajos tenores de OD y que la proporción relativa de los taxa variará según la calidad del agua en distintos sitios de muestreo. La comparación estadística entre las especies esperadas y las observadas, servirá para estimar la calidad ecológica del río (Feeney, 2014).

- El Índice de **Integridad Biológica** es una herramienta especialmente ponderosa por diversas razones (Karr, 2006). En primer lugar, el IBI basa sus conclusiones sobre la salud de un ambiente acuático en un grupo de indicadores biológicos (métricas) cada uno de los cuales mide un aspecto diferente de la comunidad biológica. En segundo lugar, las métricas en el índice reflejan respuestas testeadas y predecibles a la influencia humana: cada métrica tiene su propia curva “dosis-respuesta” asociada con el uso de la tierra u otros impactos. En tercer lugar, las métricas se eligen para que reflejen los efectos de diversas actividades humanas, tales como la urbanización o la agricultura. Desde la propuesta del IBI (*Index of Biotic Integrity*) los métodos e índices de indicación de calidad de aguas y de la integridad ecológica de los sistemas fluviales en base a las comunidades que los habitan han tenido un amplio desarrollo, que continúa hasta la actualidad (Li, 2010; Lu et al., 2015). Los programas de biomonitoreo multimétricos modelados en el marco del IBI pueden ser aplicados por científicos y gestores ambientales.

- El **índice de Integridad Biótica para el Río de la Plata (IBIRP)**, relaciona la densidad fitoplanctónica (cianobacterias planctónicas y la densidad fitoplanctónica total) con dos ensambles bentónicos (Diatomeas e invertebrados (% Tanaidacea). Éste aporta información sobre la integridad biótica temporal y espacial, pudiendo asumir valores entre 0 (muy mal estado) y 10 (muy buen estado) (Gómez et al., 2012).

- **Índice de Diatomeas Pampeano (IDP)**, fue elaborado por Gómez y Licursi (2001), con el objetivo de evaluar la eutrofización y polución orgánica de los ríos y arroyos del área pampeana Argentina. Para su desarrollo se analizaron 164 muestras de epipelon (procedentes de 50 sitios de muestreo con distintas problemáticas ambientales) y su relación con las variables fisicoquímicas. Para esta finalidad a cada taxón se le asignó un valor de sensibilidad a la polución y eutrofización, teniendo en cuenta variables estrechamente relacionadas con estos eventos, como concentración de amonio, demanda bioquímica de oxígeno (DBO5) y fósforo reactivo soluble. Se representa con la siguiente fórmula:

$$IDP = \frac{\sum_{j=1}^n I_{idp} \cdot A_j}{\sum_{j=1}^n A_j}$$

Donde:

I_{idp} = valor del IDP para la especie (fluctúa entre 0 y 4).

A_j = abundancia relativa de la especie.

Los valores del índice fluctúan entre 0 y 4, <0,5 calidad del agua muy buena y >3 muy mala. A las distintas calidades del agua se les asigna colores para su identificación gráfica en mapas y se las relaciona con las actividades antrópicas más frecuentes en el área de estudio (Licursi y Gómez 2003).

Aunque las herramientas bioindicadoras operativamente se aplican en estudios puntuales sobre sitios dentro del ecosistema, siempre está presente en la evaluación ecológica de un sistema fluvial el concepto de paisaje y la dinámica de usos de la tierra a diversas escalas (tramo, cuenca), con la consecuente influencia de estos elementos sobre los sitios de monitoreo (Allan 2004).

En general, en ambientes contaminados disminuye la cantidad de especies y por lo tanto es esperable que en esos casos se halle una baja equitabilidad y alta dominancia, lo cual nos indica que son pocas especies las especies o los taxa representados en una determinada muestra (Licursi y Gómez 2003; Gagneten et al., 2009).

Otros índices integran información de diferentes comunidades acuáticas para indicar el estado de calidad de los ecosistemas. Con el propósito de mostrar algunos ejemplos, mencionamos un índice que relaciona la “Biomasa de zooplancton total con la biomasa de fitoplancton (clorofila a)”. Considerando que frecuentemente los cambios en la comunidad zooplanctónica repercuten en el fitoplancton, la *proporción Zooplancton/Fitoplancton* es un indicador de efecto cascada, que

provee información de cuánto puede la primera comunidad regular a la segunda. Se asume que, en ambientes con mayor estrés, la eficiencia en el consumo del fitoplancton es menor (se ve reducida), dicha proporción decrece con el incremento del fósforo y el aumento de la transparencia del agua) (Jeppesen et al., 2000).

A la luz de los resultados encontrados por diversos grupos de investigación en distintas partes del mundo, pueden establecerse algunas generalizaciones en cuanto al grado de sensibilidad/tolerancia a contaminantes, y eventualmente, establecer gradientes de sensibilidad de especies o asociaciones de especies ante cada situación ambiental en particular.

Haberman y Haldna (2014), destacan la importancia del empleo de la comunidad zooplancónica como herramienta clave en la evaluación del estado trófico y la calidad de los cuerpos de agua. Estos autores, a partir de la información recopilada durante cuatro décadas, recomiendan una serie de parámetros que deberían considerarse en el análisis de la calidad de cuerpos de agua eutróficos: entre ellos, las relaciones entre el número y diversidad de especies; la representatividad de cada grupo (Cladóceros, copépodos y rotíferos) respecto al total de las especies halladas; la proporción (%) de rotíferos respecto a la abundancia total del zooplancton; la relación entre la abundancia de cladóceros de mayor talla respecto a la abundancia total de cladóceros; la relación entre la abundancia de copépodos calanoides respecto a la de copépodos ciclopoideos; y por último, la relación entre la abundancia de crustáceos y la abundancia de rotíferos. También presentan un listado de especies indicadoras de ambientes eutróficos y oligo-mesotróficos y sugieren, al igual que otros investigadores (Jeppesen et al., 2011), que se incluyan parámetros comunitarios del zooplancton en las directivas de protección acuática de la Unión Europea.

- **Índice de Diversidad de Tallas.** Es otro índice que se puede aplicar a la comunidad zooplancónica. El mismo agrupa a los organismos en relación a su talla independientemente de su taxonomía. Está basado en el índice de diversidad de Shannon-Wiener, adaptado a una variable continua (tamaño corporal), e integra la amplitud del rango de tamaños y la equitatividad. Éste índice brinda información sobre el estado trófico del sistema (incremento de P y N), la salinidad, acidificación, la temperatura y la presión de depredación.

Para mayor información sobre los índices propuestos para la comunidad zooplancónica, el modo de implementación e interpretación, así como sus ventajas y limitaciones consultar a Gallardo et al. (2011).

Clements y Newman (2002) sostienen que los enfoques multimétricos y multivariados son complementarios y pueden utilizarse en conjunto para evaluar integridad biológica. Por ejemplo, los resultados de análisis multivariados pueden usarse para identificar métricas sensibles en un índice multimétrico.

Marchese et al. (2020) sintetizaron la información sobre bioindicadores de ambientes acuáticos comprendidos en la Región de Humedales del Corredor Fluvial Chaco-Mesopotámico. Se incluyen estudios sobre macroinvertebrados bentónicos, de áreas vegetadas en humedales y de zooplancton referidos a asociación de especies indicadoras, aplicación de índices bióticos y ensayos ecotoxicológicos. Además, los autores comentan estrategias adaptativas de invertebrados para evitar

distintos tipos de estrés. Finalmente, plantean la importancia que implicaría disponer de un índice de sostenibilidad de sistemas acuáticos de la provincia de Santa Fe, integrando indicadores ecológicos y socioeconómicos que permita diagnosticar la salud ambiental de sistemas acuáticos y que constituya una herramienta valiosa para la gestión ambiental de estos sistemas.

En este sentido, la importancia de diseñar índices regionales radica en que muchos de los taxa hallados en sistemas acuáticos argentinos, presentan requerimientos ecológicos diferentes a los taxa propuestos en los listados internacionales de bioindicadores representantes del hemisferio norte.

Conclusiones parciales. Ecotoxicología del zooplancton

- La ecotoxicología, mediante estudios ecofisiológicos, ecológicos y etológicos de especies planctónicas, permite evaluar contaminación puntual y difusa de distintos contaminantes en medio acuático a distintas escalas: laboratorio, mesocosmos y campo.
- Las especies zooplanctónicas nativas son más sensibles a metales y plaguicidas que las exóticas. Sin embargo, son muy incipientes los estudios ecotoxicológicos de contaminantes emergentes tales como antibióticos y nanopartículas, por lo que se recomienda evaluar su ecotoxicidad sobre especies nativas.
- Estudios ecotoxicológicos al nivel de comunidad permiten evaluar parámetros integrados y propiedades emergentes propias de ese nivel de complejidad biológica, aspectos no detectables en bioensayos monoespecíficos.
- En ambientes acuáticos, los monitoreos fisicoquímicos y biológicos de zooplancton permiten cuantificar plaguicidas y metales y compararlos con niveles guía establecidos para la protección de la biota acuática en un marco nacional e internacional. Asimismo, se pueden establecer correlaciones entre datos fisicoquímicos y biológicos, para brindar mayor valor explicativo sobre la calidad ambiental. Cabe destacar que no existen niveles guía de calidad de agua, sedimentos y sólidos totales suspendidos referidos a contaminantes de amplio uso en Argentina, por lo que se aconseja realizar estudios ecotoxicológicos con especies nativas y proponer directrices de aplicación nacional.
- Las especies planctónicas mostraron su gran potencial como bioindicadoras de contaminación ambiental. Los monitoreos fisicoquímico y biológico a nivel de comunidades aportan conocimientos claves para evaluar efectos de contaminantes a corto y mediano plazo.

Se destaca la relevancia de integrar indicadores ecológicos y socioeconómicos que permitan diagnosticar la salud ambiental de los sistemas acuáticos y que constituya una herramienta valiosa para la gestión ambiental de los mismos.

Conclusiones generales

Si los ecotoxicólogos acuerdan en la importancia que las interacciones interespecíficas tienen en la regulación de las comunidades naturales, los esfuerzos de investigación deben orientarse a comprender cómo los contaminantes influyen en estas interacciones.

En ecotoxicología, un gran desafío es la separación de los cambios inducidos por contaminantes sobre la diversidad y composición de especies, de los producidos por la variación natural de los factores ambientales.

Los tópicos de investigación actuales en ecotoxicología de comunidades pueden resumirse en algunas categorías: 1) mejorar la comprensión de los factores ecológicos que regulan la dinámica de las comunidades; 2) integrar enfoques experimentales y de biomonitoreo. Un nuevo eje, de incipiente desarrollo en los últimos años en la ecotoxicología de comunidades sería mejorar el conocimiento del efecto de los estresores atmosféricos en las respuestas de las comunidades.

En relación con la escala de estudios ecotoxicológicos (laboratorio *versus* campo con las respectivas ventajas y limitaciones previamente señaladas), es claro que mientras el enfoque experimental a pequeña escala provee resultados “claros” con buen control de variables bióticas y abióticas, los programas de investigación de microcosmos deberían ser complementados y bien integrados con estudios de campo.

Para definir cuál es el enfoque experimental apropiado en ecotoxicología de comunidades, deben tenerse en cuenta:

- 1) Cuestiones relacionadas con la escala espacio-temporal: Realizar experimentos a diferentes escalas espaciales y temporales a través de diferentes niveles de organización biológica, compensa al menos parcialmente la falta de realismo ecológico del enfoque experimental. Siempre que sea posible, es recomendable complementar la información recabada, con biomonitoreo ambiental.
- 2) Los ensayos uniespecíficos deberían usarse para documentar las diferencias de sensibilidad entre especies, o para comparar las respuestas a un mismo tóxico, de especies nativas con estandarizadas.
- 3) La integración de los enfoques descriptivos y experimentales. Todos los enfoques experimentales que se utilizan en ecotoxicología de comunidades tienen limitaciones importantes. Además, aun cuando un experimento esté bien diseñado con fuerza estadística suficiente para demostrar el efecto de un determinado factor, siempre queda sin resolver la importancia del factor estudiado en relación con otros no investigados, aunque potencialmente importantes. Un programa de investigación exitoso debería integrar teoría, observación y experimentación (Clements y Newman 2002).

Finalmente, e independientemente de si los experimentos se realizan para poner a prueba predicciones o para determinar la importancia relativa de factores causales, dos problemas clave con que se enfrenta el ecotoxicólogo de comunidades son la posibilidad de *generalización* y de *extrapolación* de los resultados obtenidos, restricción que puede subsanarse en parte realizando

estudios integradores de distintas escalas espacio-temporales. Por otro lado, los estudios ecotoxicológicos deberían realizarse siempre teniendo en cuenta la historia natural y el marco teórico ecológico en el que se inscriben las hipótesis de trabajo.

Bibliografía

- Alonso, L. L. Demetrio P. M., Etchegoyen M. A., y Marino D. J. (2018) Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Science or the Total Environment* 645:89-96
- Allan J. D (2004) Landscapes and Riverscapes: The Influence of Land Use on Stream Ecosystems. *Annu. Rev. Stable*, 35, 257–284.
- Andrade, V; Polla, W. Gutierrez, F; Regaldo, L., Reno, U.; Propielatz; Gervasio, S. y Gagneten AM. (2019) Direct and Indirect Effect of a Glyphosate Formulation on Freshwater Plankton: a Mesocosm Study. *Journal of Experimental Biology*. En prensa.
- Andrade VS, Gutiérrez MF, Propielarz A, Gervasio S, Reno U, Gagneten AM. (2021) Synergy between glyphosate and cypermethrin formulations on zooplankton: evidences from a single-specie test and a community mesocosm experiment. *Journal Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12619-0>
- Andrade, VS; Gutiérrez MF; Fantón, N. Gagneten, AM. (2018) Shifts in zooplankton behavior caused by a mixture of pesticides. *Water, Air & Soil Pollution*. 229:107.
- Andreotti, C. y Gagneten, A.M. (2006) Efectos ecotoxicológicos del sedimento del río Salado inferior (Argentina) en la sobrevivencia y reproducción de *Moina micrura* (Crustacea, Cladocera). *Rev. Toxicol.* 23: 146-150.
- Anon. (1991) Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. In: Workshop at Monks Wood Experimental Station, Abbots Ripton, p. 46. Huntingdon, UK.
- Begon, M., Harper, J.L. y Townsend, C.R. (1988). *Ecología, individuos, poblaciones y comunidades*. Ediciones Omega S.A., Barcelona, 886 pp.
- Cairns J Jr.; Cherry DS (1998) Ch. 7. Multi-species Test Systems. In: *Handbook of Ecotoxicology* Edited by Peter Calow. Blackwell Science Ltd.
- Cairns, J. Jr. (1986) *Community Toxicity Testing*, STP. ASTM, Philadelphia, 350 pp.
- Cairs Jr.; Cherry, D.S. (2009) Ch. 7. Freshwater Multi Species test systems. In: *Handbook of Ecotoxicology*. Calow, P. (Ed.) 900 pp.
- Calow, P. (1998) *Handbook of Ecotoxicology* Edited by Peter Calow. Blackwell Science Ltd.
- Ceresoli, N. y Gagneten, A.M. (2004) "Efectos del efluente de curtiembre sobre *Ceriodaphnia dubia* (Crustacea, Cladocera) en condiciones experimentales". *Interciencia* 28 N° 8: 469-475.
- Clement MF.M. y Newman (2002). *Ecotoxicology: A comprehensive treatement*.
- Eaton, J., Arthur, J., Hermanutz, R., Kiefer, R., Mueller, L., Anderson, R., Erickson, R., Nordling, B., Rogers, R. & Pritchard, H. (1985) Biological effects of continuous and intermittent dosing of

- outdoor experimental streams with chlorpyrifos. In: Aquatic Toxicology and Hazard Assessment. 8th Symposium. ASTM STP 891 (Eds R.C Bahner & D.J. Hansen), pp. 85-118. American Society of Testing and Materials, Philadelphia.
- EPA (2002a) Method 1002.0: Daphnid, *Ceriodaphnia dubia*, Survival and Reproduction Test; Chronic Toxicity.
- EPA (2002b) Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms Fourth Edition.
- EPA (2002c) Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms Fifth Edition.
- Feeney, Anna (2014-12-18). "RIVPACS reference database". Centre for Ecology & Hydrology. Retrieved 2017-09-14.
- Gagneten, A.M. y Vila, I. (2001). "Effects of Cu⁺² and pH on the fitness of *Ceriodaphnia dubia* (Richard 1894) (Crustacea, Cladocera) in microcosm experiments". *Environmental Toxicology* 16 (5): 428-438.
- Gagneten, A.M. (2002) "Respuesta de una comunidad zooplanctónica de agua dulce a la aplicación de cromo en clausuras experimentales". *Interciencia* 27 (10): 563-570.
- Gagneten, A.M. y Marchese, M. (2003) "Effects of Paraquat on zooplankton and zoobenthic assemblages in enclosure experiments". *Ecohydrology and Hydrobiologie*. Vol 3 (4): 255-264.
- Gagneten, A.M., Gervasio, S. and Paggi, J. C. (2007) Heavy Metal Pollution and Eutrophication in the Lower Salado River Basin (Argentina). *Water, Air and Soil Pollution*. 178: 335-349.
- Gagneten, A.M.; Ceresoli, N. (2004) Efectos del efluente de curtiembre sobre la abundancia y riqueza de especies del zooplancton en el Arroyo Las Prusianas (Santa Fe, Argentina). *Interciencia* 29 (12): 702-708.
- Gagneten, A.M.; Marchese, M. (2003) Effects of Paraquat on zooplankton and zoobenthic assemblages in enclosure experiments. *Ecohydrology and Hydrobiologie*. Vol 3 (4): 255-264.
- Gagneten, A.M.; Paggi, J.C. (2009). Effects of heavy metal contamination (Cr, Cu, Pb, Cd) and eutrophication on zooplankton in the lower basin of the Salado River (Argentina). *Water, Air and Soil Pollution* 198: 317-334.
- Gagneten, AM., Plá R.R., Regaldo L. and Paggi J.C. (2009). Assesment of Bioconcentration Factor of Chromium by Instrumental Neutron Activation Analysis in *Argyrodiaptomus falcifer* Da-day, a subtropical freshwater copepod. *Water, Air and Soil Pollution*. 204 (1-4): 133-138.
- Gagneten, A.M.; Vila, I. (2001) Effects of Cu⁺² and pH on the fitness of *Ceriodaphnia dubia* (Richard 1894) (Crustacea, Cladocera) in microcosm experiments. *Environmental Toxicology* 16 (5): 428-438.
- Gagneten, A. M. (2011) Effects of Contamination by Heavy Metals and Eutrophication on Zooplankton, and their possible effects on the Throphic Webs of Freshwater Aquatic Ecosystems. En: *Eutrophication: causes, consequences and control*. Ansari, A.A.; Singh Gill, S.; Lanza, G.R.; Rast, W. (Eds.) 1st Edition 394 p., ISBN: 978-90-481-9624-1

- Gagneten, AM; Maitre, MI, Reno, U., Regaldo, L., Roldán, S y Enrique, S. (2014) Efectos del herbicida Ron-do® sobre *Cerodaphnia reticulata* (Crustacea, Cladocera) y degradabilidad del glifosato (N-fosfometilglicina) en condiciones experimentales. *Natura Neotropicalis* 45 (1 y 2): 71-85.
- Gallardo, B., Gascón S., Quintana X.; Comín FA. (2011) How to choose a biodiversity indicator- Redundancy and complementarity of biodiversity metrics in a freshwater ecosystem. *Ecological Indicators*, 11: 1177-1184.
- Gecklcr, F.R., Homing, W.B., Neiheisel, T.M.; Pickering Q.H., Robinson, E.L.; Stephan, C.E. (1976) Validity of laboratory tests for predicting copper toxicity in streams, EPA-600/3-76-116. National Technical Information Service, Springfield, VA.
- Giddings, J.M. (1986) A microcosm procedure for determining safe levels of chemical exposure in shallow water communities. In: *Community Toxicity Testing*, STP 920 (Ed. 1. Cairns Jr, pp. 121-131. ASTM, Philadelphia,
- Giesy, J.P., Allred, P.M. (1985) Replicability of aquatic multispecies test systems. In: *Multispecies Toxicity*.
- Gómez N. and Licursi M. 2001. The Pampean Diatom Index (IDP) for assessment of rivers and streams in Argentina. *Aquatic Ecology*, 5: 173-181.
- Gómez, N. (2012) Contribución de los índices bióticos regionales a la gestión ambiental de ecosistemas acuáticos pampeanos. En: *Aplicación de indicadores biológicos en cursos de agua de la ecorregión Pampa*. Rodríguez Capitulo, A. y Gómez, N. Ed.s
- Gutierrez MF, Paggi JC and Gagneten AM (2011) Microcrustaceans escape behavior as an early bioindicator of copper, chromium and endosulfan toxicity. *Ecotoxicology* 21 (2): 428-438.
- Gutiérrez, MF. Gagneten, AM y Paggi, JC (2012) Exposure to sublethal chromium and endosulfan concentrations alter the diel vertical migration (DVM) in different zooplanktonic species. *Ecotoxicology* 21(1):37-47
- Gutiérrez, MF. Gagneten, AM y Paggi, JC (2012a) Exposure to sublethal chromium and endosulfan concentrations alter the diel vertical migration (DVM) in different zooplanktonic species. *Ecotoxicology* 21(1):37-47.
- Gutierrez MF, Paggi JC and Gagneten AM (2012b) Infodisruptions in predator-prey interactions: Xenobiotics alter microcrustaceans responses to fish infochemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 81:11-16.
- Gutierrez, MF, Andrade V.1; Fantón N., Gagneten AM. (2016) Facing predation risk in aquatic systems: differential response of zooplankton and habituation to the false alarm. *Fundamental and Applied Limnology*. 184 (4): 329-339.
- Hanazato, T. (1998) Response of a zooplankton community to insecticide application in experimental ponds: a review and the implications of the effects of chemicals on the structure and functioning of freshwater communities. *Environmental Pollution*, 101: 361-373.
- Havens, KE (1994) An experimental comparison of the effects of two chemical stressors on a freshwater zooplankton assemblage. *Environmental Pollution*, 84:245-251.

- Jeppesen, E., Jensen, JP, Sondergaard, M. et al (2000). Trophic structure, species richness and biodiversity in Danish lakes: changes along a phosphorous gradient. *Freshwater Biology*. 45 (2) 201-218.
- Jeppesen, E., Jensen, JP, Sondergaard, M. et al (2000). Trophic structure, species richness and biodiversity in Danish lakes: changes along a phosphorous gradient. *Freshwater Biology*. 45 (2) 201-218.
- José de Paggi, S. 1997. Efectos de los Pesticidas sobre el Zooplancton de las Aguas Continentales: Análisis Revisivo. *FABICIB*, 1: 103-114
- Jose de Paggi, S.; J. C. Paggi, P. Collins, J. Collins, G. Bernal (2008) Water quality and zooplankton composition in a receiving pond of stormwater runoff from an urban catchment. *Journal of Environmental Biology*, 29 (5): 693-700.
- Karr, JR, KD Fausch, PL Angermeier, PR Yant, IJ Schlosser (1986) Assessing biological integrity in running waters: A method and its rationale. *Illinois Nat. Hist. Surv. Spec. Publ.* 5, 5(August), 28.
- Li L, Zheng B, Liu L (2010) Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: Definitions, approaches and trends. *Procedia Environ. Sci.*, 2, 1510–1524.
- Liber, KN, Kaushik, NK, Solomon, KR Carey, JH (1992) Experimental Designs for Aquatic Mesocosm Studies: A Comparison of the "Anova" and "Regression" Design for Assessing the Impact of Tetrachlorophenol on Zooplankton Populations in Limnocorals. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 61-77.
- Licursi M y Gómez N. 2003. Aplicación de índices bióticos en la evaluación de la calidad de agua en sistemas lóticos de la llanura pampeana Argentina a partir del empleo de diatomeas. *Biología Acuática*, 21: 31-49.
- Lu Y, Wang R, Zhang Y, Su H, Wang P, Jenkins, A, Squire G (2015) Ecosystem health towards sustainability. *Ecosyst. Heal. Sustain.*, 1(1), 1–15.
- Ludwig, J. & Reynolds, J. (1988). *Statistical Ecology*. New York: John Wiley.
- Luoma, S.N. y Rainbow P.S. (2005). Metal accumulation in aquatic ecosystems. *Environmental Science and Technology* 39 (7) 1921-1931.
- Magurran, A.E. (1988) *Ecological Diversity and its Measurement*. Croom Helm, London.
- Maine, MA, Panigatti MC., Suñé N.L; Pizarro M. J. (1996) Phosphorus forms in lotic and lentic environments of the Middle Paraná flood Valley (Argentina). *Polskie Archiwum Hydrobiologie*, 43(4): 391-400.
- Marchese, M. Gagneten, AM, Parma, MJ and Pavé, P. (2008) Accumulation and elimination of chromium by freshwater species exposed to spiked sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55:603–609.
- Marchese, M., Gagneten, A.M., Montalto, L., Gallardo L.I., Damborsky M. P. y Poi, A.S.G. (2020) Aplicación de Indicadores Biológicos en el Nordeste Argentino. En: en el libro "La bioindicación en el monitoreo y evaluación de los sistemas fluviales de la Argentina: Bases para el análisis de la integridad ecológica". E. Dominguez, A. Giorgi y N. Gómez (Comps.) Eds. Min. Amb., CONICET; RemAqua Eds. ISBN: ISBN 978-950-23-3006-8

- Megenazzo, E.; Regaldo, L. & Gagneten, A.M. (2016). El zooplancton de arroyos de la provincia de Santa Fe (Argentina) con presencia de microcontaminantes inorgánicos y plaguicidas. Tesis de la Lic. En Biodiversidad. Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral. 67 pp.
- Newman et al. (2015) Chapter 11. Effects to Communities and Ecosystems. En: Fundamentals of Ecotoxicology. 4th ed.
- Odum, E. P. (1971). Fundamentals of Ecology. Philadelphia, Saunders.
- O'Neill, R.V., D. L. Deangelis, J. B. Waide, T. F. H. Allen (1986) A Hierarchical Concept of Ecosystems. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Wilson, E.O. (1988) Biodiversity. National Academy Press, Washington, DC.
- OECD 301 (1992) OECD Guideline for testing of chemicals.
- Pantle, R., Buck, H. (1955): Die Biologische Überwachung der Gewässer und die Darstellung der Ergebnisse. GWF, 96, 603 pp.
- Paracampo A.H., García, I.D., Mugni, H.D., Marrochi, M.N., Carriquiriborde, P. et al. (2015). Studies on Neotropical Fauna and Environment 50, 3: 7-9. Fish assemblage of a Pampasic stream (Buenos Aires, Argentina).
- Primost J.E., Marino, D.J., Aparicio, V.C., Costa, J.L., Carriquiriborde, P. (2017) Glyphosate and AMPA, "pseudopersistent" plutants under real world agricultural management practices in the mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. Environ. Pollut. 229, 771-779.
- Regaldo L, Gagneten AM, Troiani H. (2014) Comparative study of the effects of Cu, Cr, Pb on *Daphnia magna* and two cladocerans representatives of the Argentinean Fluvial Littoral (AFL). (2014) Journal of Environmental Biology Vol. 35 (4): 689-697.
- Regaldo L, Gagneten, A.M., Troiani, H. (2009) Accumulation of Chromium and interaction with other elements in *Chlorella vulgaris* (Chloroficeae) and *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). Journal of Environmental Biology. Vol. 30 (2): 213-216.
- Regaldo, L.; Gutierrez, M.F.; Reno, U; Fernández, V.; Gervasio, S; Repetti, M.R., Gagneten, A.M. (2017) Water and sediment quality assessment: Impact of industry and agriculture on aquatic ecosystems in Santa Fe (Argentina). Environmental Science and Pollution Research. 1-18.
- Regaldo L., Reno U., Romero N., Gagneten A.M. Ecotoxicidad de lixiviados de Residuos Sólidos Urbanos (RSU) del relleno sanitario de la ciudad de Santa Fe (Argentina). VII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC ARG). Octubre 2018, San Luis.
- Regaldo, L. Gutierrez, Reno U, Fernández V, Gervasio S, Repetti MR, Gagneten AM. (2018) Water and sediment quality assessment in the Colastiné-Corralito stream system (Santa Fe, Argentina): impact of industry and agriculture on aquatic ecosystems Environmental Science and Pollution Research. 25 (7): 6951-6968.
- Reno, U, Regaldo, L y Gagneten AM. (2016) Efectos subletales de cuatro formulaciones de glifosato sobre *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia* (Crustacea, Cladocera). Natura Neotropicalis. 47: 7-20.
- Reno, U.; Gutierrez, M.F.; Regaldo, L. & Gagneten A.M (2015) Impact of Eskoba®, a glyphosate formulation, on the freshwater plankton community. Water Environmental Research. 86 (12): 2294-2300.

- Reno, U.; Regaldo, L.; Ayarragaray, M.; Mendez, E.; Gagneten, A.M. (2018) Monitoreo de plaguicidas y empleo de bioindicadores como herramientas de la gestión ambiental para dar respuesta a demandas sociales. *Periurbanos Hacia el Consenso*. Tittone P & Giobellina B. Compiladores. Buenos Aires, INTA. 673 pp.
- Reno, U.; Regaldo, L.; Vidal, E.; Mariani, M.; Zalazar, C. y Gagneten, A.M. (2015) Water polluted with glyphosate formulations: effectiveness of a decontamination process using *Chlorella vulgaris* growing as bioindicator. *Journal of Applied Phycology* 28(4), 2279-2286.
- Reno, U. Doyle S; Momo F; Regaldo L; Gagneten AM (2018) Effects of glyphosate formulations on population dynamics of freshwater microcrustaceans. *Ecotoxicology Special Issue: Pesticides*. 27(7):784-793.
- Romero N., Attademo A., Reno U., Regaldo L., Repetti M.R., Lajmanovich R., Gagneten, A.M. (2021) Analysis of the zooplanktonic community in rice cultivars during a crop cycle in agroecological versus conventional management. En revisión.
- Salomons, W., Förstner, U. (1984) *Metals in the hydrocycle* (p. 349). Berlin Heidelberg New York: Springer.
- Schindler, D.W. (1974) Experimental studies of eutrophication and lake recovery: Some implications of lake management. *Science* 184, H97 -899.
- Schindler, D.W. (1985) Detecting ecosystem responses to anthropogenic stress. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44, 6-25.
- Seidler, R.J. Ed.1 (1991) The use and development of environmentally controlled chambers mesocosms for evaluating biotechnology products. *Proceedings of a Workshop on the Use and Development of Terrestrial Mesocosms*, EPA/69~C:O-0021. US EPA Environmental Research Laboratory, Corvallis, Oregon.
- Society for Environmental Toxicology and Chemistry (1992) *Workshop on aquatic microcosms for ecological assessment of pesticides*. SETAC Foundation for Environmental Education, Pensacola, Florida.
- Touart, L.W. (1988) *Aquatic Mesocosm Tests to Support Pesticide Registrations*. EPA 540/09-88-035. US EPA Office of Pesticide Programs, Washington, DC. US EPA, Minnesota.
- Trevors J.T., Saier M.H Jr. (2008) *Three Laws of Biology*. DOI 10.1007/s11270-008-9925-3.
- Van Opstal N., Gagneten A.M., Sasal C., Regaldo L., Wilson M., Seehaus M., Gabioud Relevamiento cualitativo de la comunidad zooplanctónica de una cuenca del norte Entrerriano. VII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC ARG). Octubre 2018, San Luis.
- Van Opstal N.V.; Sasal M.C. y Gagneten A.M. Análisis del avance de la frontera agrícola y del efecto de plaguicidas sobre comunidad indicadora de agua dulce superficial. *Periurbanos hacia el consenso*. Córdoba, 12-14/09/2017.
- Willson, E. y Peter, FM. (1988). *Biodiversity*. National Academic Press. Washington, D.C. 521 p.

CUARTA PARTE

Herramientas de la Ecotoxicología

CAPÍTULO 12

Bioensayos de toxicidad

Leticia Peluso

La actividad humana genera grandes cantidades de desechos tóxicos que son liberados al ambiente, ingresando a los diferentes compartimentos de los ecosistemas, ya sea aire, agua, suelo o biota, dependiendo su destino de las propiedades fisicoquímicas, movilidad y persistencia de los compuestos que la integran. Los cuerpos de agua reciben directa o indirectamente descargas de contaminantes como consecuencia de las diferentes actividades antrópicas que tienen lugar en las cercanías de los mismos ([Figura 12.1.](#)).

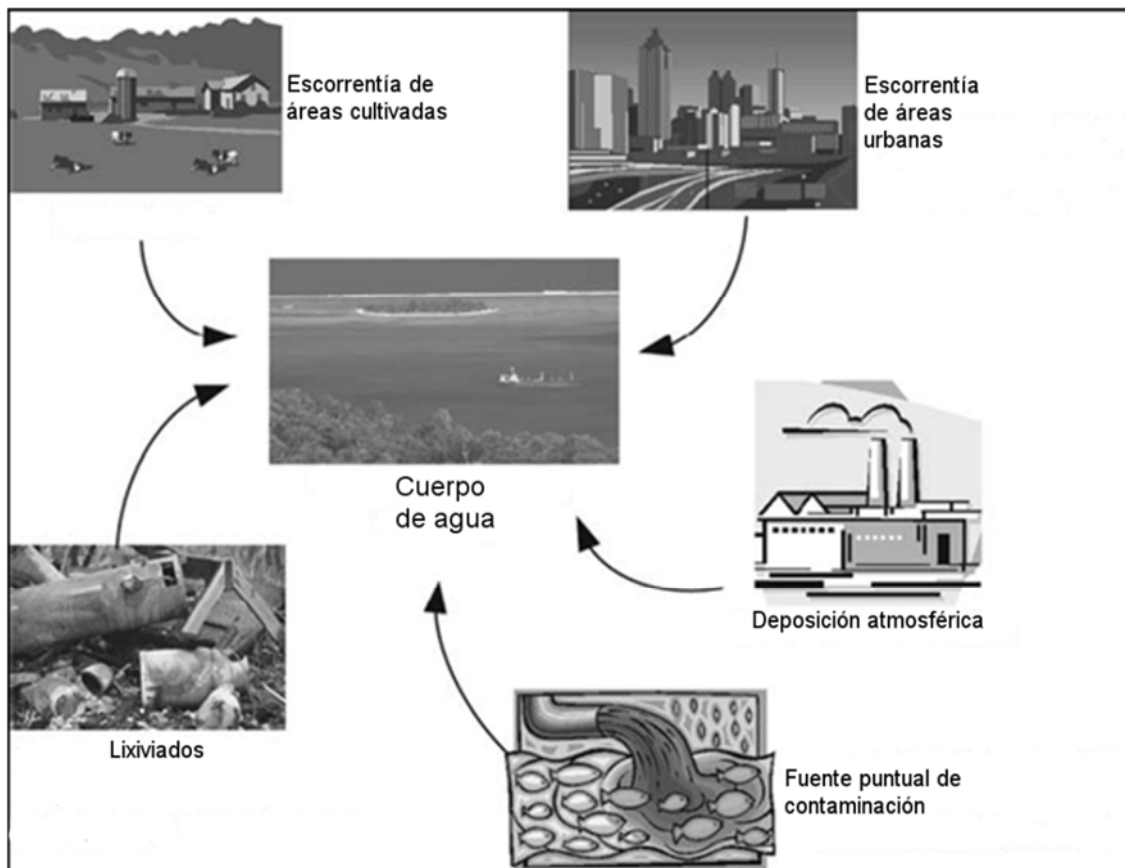


Figura 12.1: Esquema general de las fuentes de contaminación sobre ambientes acuáticos

Para evaluar los efectos potencialmente perjudiciales de una sustancia química (u otro agente) sobre la biota, es necesario establecer una relación cuantitativa reproducible entre la exposición química y un cierto grado de daño para el organismo o grupo de organismos bajo investigación.

La preservación de la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas, así como la protección de la salud humana, se fundamenta en la evaluación del peligro de los productos químicos artificiales, dicha evaluación se basa principalmente en el uso de pruebas de (eco) toxicidad. El objetivo de estas pruebas es generar información cuantitativa o cualitativa sobre los efectos no deseados de los xenobióticos para su regulación, según lo solicitado por numerosas autoridades reguladoras de todo el mundo, para estimar concentraciones aceptables de contaminantes en el agua y los alimentos, para establecer límites de exposición permisibles para los trabajadores, y para proteger la biota.

En este contexto, se han desarrollado numerosas pruebas de toxicidad aguda y crónica en los últimos 30 años para la evaluación del peligro ambiental de los productos químicos. Debido a que una sola especie o punto final no puede reflejar adecuadamente los efectos producidos por los contaminantes sobre toda la biota en el ecosistema en estudio, es común utilizar varias especies de prueba que generalmente representan diferentes niveles tróficos para tratar de reflejar la situación ambiental de la manera más realista posible.

Bioensayos de toxicidad

Para evaluar los efectos perjudiciales potenciales de un químico (u otro agente) sobre la biota, es necesario establecer una relación cuantitativa reproducible entre la **exposición** a las sustancias químicas y alguna medida de daño al organismo o grupo de organismos bajo investigación. La mayoría de los datos toxicológicos ambientales actuales provienen de **ensayos de laboratorio** controlados y generalmente involucran productos químicos individuales y poblaciones muy pequeñas de organismos de prueba. Incluso en un bioensayo de toxicidad estándar, se intenta simular lo que sucedería en una gran población observando quizás solo 30 individuos por exposición o tratamiento. Las hipótesis sobre el mecanismo de acción tóxica de una sustancia química específica o grupo de sustancias químicas generalmente se prueban a nivel celular o subcelular sobre la base de las cuales los investigadores a menudo hacen suposiciones sobre cómo un cambio bioquímico o fisiológico particular puede afectar la aptitud general del organismo.

Al vincular la respuesta del organismo con la de una población, también estamos haciendo suposiciones sobre cómo las respuestas tóxicas de los individuos pueden reflejarse en niveles más altos de organización biológica. Este tipo de enfoque se muestra en el esquema "anidado" de la [Figura 12.2](#), donde los efectos celulares implican efectos en todos los niveles de organización biológica. Claramente, esto representa una simplificación excesiva. Las áreas sombreadas en la figura representan donde se trabaja con mayor incertidumbre. Por ejemplo, una respuesta a nivel de sub-organismo, tal como una alteración en la actividad enzimática o la respuesta in-

mune, pueden representar una reacción saludable a un estrés; por lo tanto, encontrar una relación cuantitativa entre dicha respuesta y el estado de salud de un organismo puede ser difícil. La extrapolación del nivel de individuo a la población o comunidad presenta un conjunto diferente de problemas. Por ejemplo, los efectos disruptivos de los humanos en el ecosistema deben ser vistos dentro del contexto de variaciones físicas y químicas naturales dentro del medio ambiente, como los efectos climatológicos. Además, los organismos pueden adaptarse a la contaminación provocada por el hombre de la misma manera que pueden adaptarse a muchas otras variables ambientales, como la temperatura, la salinidad y la disponibilidad de alimentos y oxígeno.

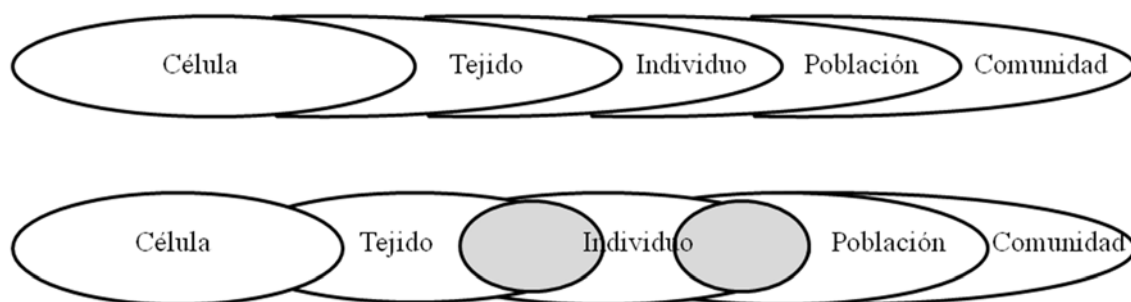


Figura 12.2: Esquema conceptual de la relación de los efectos tóxicos en diferentes niveles de organización biológica. Las zonas grises representan las áreas de incertidumbre.

Un aspecto fundamental de la investigación toxicológica es la relación entre la cantidad de exposición química y el grado de respuesta tóxica. Esta relación de respuesta a la dosis generalmente se evalúa utilizando un **ensayo de toxicidad**. La relación entre exposición química y toxicidad es fundamental para la investigación toxicológica. Típicamente, la relación se caracteriza por la relación entre dos variables: **dosis y respuesta**. Una dosis es una medida de la cantidad de sustancia química absorbida o ingerida por el organismo y puede cuantificarse o estimarse de varias maneras diferentes. En los ensayos de toxicidad que involucran vertebrados terrestres, la dosis puede circunscribirse con precisión inyectando una cantidad exacta de producto químico en el organismo. Sin embargo, en varios estudios ecotoxicológicos, la dosis está implícita en una medida de la **concentración química en el medio de exposición** (por ejemplo, aire, agua o sedimento) y un conocimiento del tiempo total de exposición. Juntos, estos dos parámetros proporcionan una medida de exposición en lugar de dosis, y, aunque el término dosis-respuesta se usa comúnmente para describir ensayos de laboratorio, lo que a menudo determinamos es una relación **concentración-respuesta**. El término exposición tiene una gran relevancia para un entorno de campo, donde las estimaciones de la concentración química ambiental y el tiempo de exposición proporcionan la base para la estimación del riesgo cuando se combinan con datos de laboratorio y otras exposiciones controladas.

Los ensayos de toxicidad se realizan exponiendo una población representativa de organismos a un rango de concentraciones de un químico o de una muestra ambiental y registrando las

respuestas, o **puntos finales**, durante un período de tiempo. Las respuestas pueden ser un fenómeno de todo o nada (cuantitativo) como la mortalidad, o pueden ser efectos graduales como el crecimiento o el rendimiento en la reproducción (fecundidad). Un punto final puede ser cualquier respuesta cuantificable que pueda estar relacionada con la dosis química o la exposición y puede incluir cambios en la actividad enzimática, química tisular, patología o incluso cambios de comportamiento.

Dependiendo del tiempo al cual sean expuestos los organismos de prueba en los ensayos de toxicidad, los mismos pueden ser de tipo **agudo** o **crónico**. Los ensayos de toxicidad agudos son pruebas de corta duración con el objetivo de medir el efecto de sustancias tóxicas sobre los organismos prueba durante un período corto de su ciclo de vida. En cambio, los ensayos crónicos fueron diseñados para evaluar los efectos de los tóxicos durante una porción significativa del ciclo de vida de los organismos, en general un 10% o más del total del ciclo de vida. En términos generales, estas pruebas de toxicidad se utilizan con varios fines como por ejemplo evaluación de toxicidad de compuestos específicos, control de calidad de efluentes y cuerpos de agua (agua y sedimentos), para derivar criterios de calidad del agua para la liberación segura de productos químicos individuales en cuerpos de agua, determinar la sensibilidad relativa de algún compuesto en particular, determinar la calidad de suelos, etcétera.

Tal como se hace la distinción entre **exposición** aguda o crónica a un tóxico, lo mismo se puede aplicar al tipo de **efectos**. Los **efectos agudos** son los que ocurren como resultado de una exposición corta. Por ejemplo, en peces u otros organismos acuáticos, se consideran efectos agudos a los que ocurren entre unas horas y días luego de la exposición, y suelen ser bastante severos. Los **efectos crónicos o subcrónicos** suelen observarse cuando un químico produce efectos adversos luego de una exposición a largo plazo a niveles bajos de uno o más tóxicos, y estos efectos pueden ser letales o sub-letales.

Debido a que puede haber confusión en el uso de los términos agudo y crónico para describir tanto exposición como efectos, algunos autores definieron **ensayos a corto y largo plazo** para referirse a la duración de la exposición, y los términos **letal y sub-letal** para el tipo de efecto. De esta forma en un ensayo a corto plazo se pueden evaluar efectos de tipo letal o sub-letales, sin embargo, en ensayos de laboratorio de este tipo los efectos sub-letales no se llegan a observar. Una forma de evaluar efectos sub-letales es utilizar tiempos de exposición prolongados.

Puntos finales

En ecotoxicología se denomina punto final de ensayo a los valores obtenidos de una prueba de toxicidad como resultado de mediciones específicas realizadas sobre los organismos de prueba cuando finaliza el tiempo de exposición. Las medidas de efecto se refieren a las variables analizadas en una prueba en particular, las más comunes incluyen descripciones del efecto de sustancias tóxicas sobre la supervivencia, el crecimiento y la reproducción de organismos de una especie. Otras medidas de efecto incluyen descripciones de efectos a nivel de comunidad (respiración, fotosíntesis, diversidad) o efectos a nivel celular como efectos histológicos, fisiológicos

o bioquímicos. En cada caso el punto final es una variable cuantitativa utilizada para evaluar los efectos tóxicos sobre un individuo, población o comunidad determinada.

Como se mencionó anteriormente, los efectos adversos a nivel de organismo incluyen mortalidad a corto y largo plazo, y efectos sub-letales como cambios en el comportamiento, crecimiento, desarrollo, reproducción e histología. Los efectos a nivel sub-organísmico pueden incluir inducción o inhibición de enzimas o sistemas enzimáticos y sus funciones asociadas. En relación a los efectos supra-organísmicos se pueden medir cambios en el genotipo y/o fenotipo, así como cambios en número, la abundancia relativa y cambios en las condiciones fisiológicas en especies pertenecientes a una comunidad dada.

En cuanto a la **letalidad**, es una respuesta del tipo todo o nada para la cual Finney (1971) propuso el nombre de respuesta cuantal. El conjunto de respuestas todo o nada poseen una distribución de frecuencias denominada binomial. El objetivo final del análisis e interpretación de las **curvas Concentración-Respuesta (C-R)** es estimar una serie de parámetros toxicológicos que sintetizan y permiten una rápida y sencilla comparación de la toxicidad de un compuesto o de la sensibilidad relativa de diferentes especies, como también la comparación de diferentes condiciones de ensayo para una misma especie. Entre los parámetros toxicológicos más usados que se calculan a **partir de las curvas C-R se encuentran la CL50/CE50**: concentración letal o de efecto medio, la cual indica la concentración letal o de efecto para el 50% de los organismos expuestos. La CL50 tiene una mayor utilidad si se obtienen parámetros tales como los intervalos de confianza al 95% y la pendiente de la curva C-R. La **Figura 12.3.** muestra curvas de C-R obtenidas para ensayos agudos (96 horas de exposición) en agua con la especie *Hyalella curvispina* expuestos a zinc y cromo llevados a cabo por dos laboratorios diferentes.

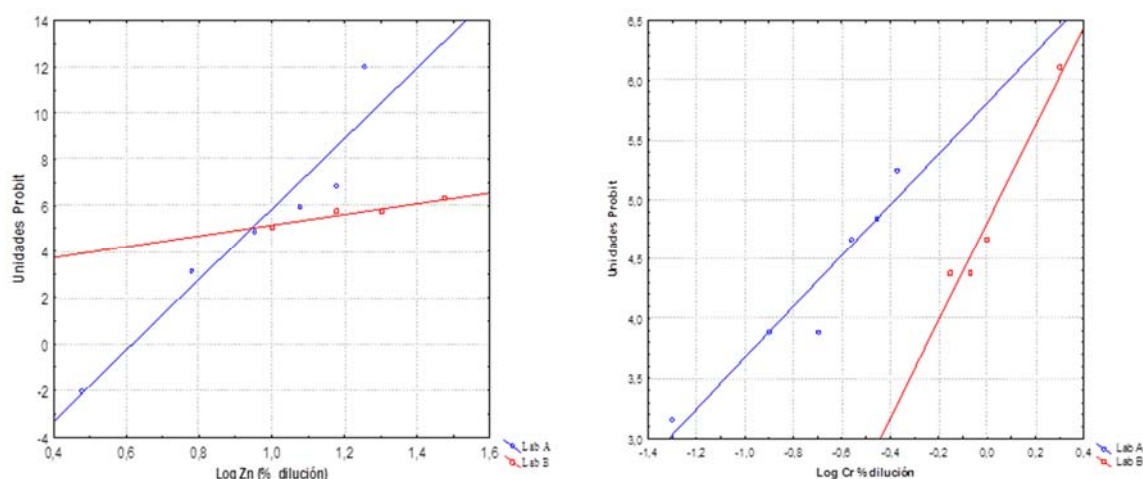


Figura 12.3: Comparación de curvas C-R entre los ensayos en los laboratorios A y B. a: curvas C-R para cromo; b: curvas C-R para zinc. Las líneas punteadas indican la estimación de la concentración a partir del 50% de mortalidad (5 unidades Probit), para las curvas estimadas

El **NOEC** (concentración de efecto no observado - pruebas agudas y crónicas) es la **concentración más alta en la que no hay una diferencia significativa** con respecto al tratamiento de control. El **LOEC** (concentración de efecto más baja observada - pruebas agudas y crónicas) es la **concentración más baja en la que hay una diferencia significativa** con respecto al tratamiento de control. El NOEC y el LOEC se determinan examinando los datos y comparando los tratamientos con el control para detectar diferencias significativas a través de pruebas de hipótesis. Los efectos pueden ser mortalidad, inmovilización, recuento celular reducido (algas) u observaciones conductuales. Estos puntos finales generalmente se determinan mediante pruebas t y análisis de varianza (ANOVA) y con mayor frecuencia se asocian con pruebas crónicas. Los NOEC/LOEC dependen de la concentración y no tienen intervalos de confianza asociados. También la LC10 podría usarse como un sustituto de la concentración sin efecto observada para las pruebas agudas. Esto proporciona un enfoque estadísticamente válido para calcular el punto final y hace posible estimar cuándo la concentración más baja produce efectos mayores al 10%.

Bioensayos estandarizados

Cuando se llevan a cabo ensayos de toxicidad es importante utilizar procedimientos estandarizados que permitan una comparación de los resultados obtenidos intra e interlaboratorios. Existen metodologías estandarizadas recomendadas por ciertos Organismos internacionales como Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (U.S. Environmental Protection Agency - US EPA), la Agencia Ambiental Canadiense (Environmental Canada - EC), la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (Organization for Economic Cooperation and Development -OECD), junto a organismos de estandarización y racionalización como American Society for Testing and Materials (ASTM), además en nuestro país se encuentra disponibles las normas Argentinas IRAM, para llevar a cabo ensayos de toxicidad. Estos procedimientos también proporcionan recomendaciones para la toma, manipulación y conservación de muestras y selección de tóxicos de referencia para ser utilizados en los ensayos de toxicidad.

Para poder desarrollar un ensayo de toxicidad y estandarizarlo, este debe cumplir ciertos requisitos como por ejemplo:

- Debe ser aceptado por la comunidad científica
- La prueba debe tener una buena base estadística, y debe ser repetible y generar resultados similares entre laboratorios.
- Los datos obtenidos deben incluir efectos en un amplio rango de concentraciones dentro de tiempos de exposición realistas.
- La prueba debe ser capaz de predecir lo que sucede en campo para organismos similares.
- El ensayo debe ser de fácil ejecución y económico.
- Debe ser lo más sensible y realista posible en relación a su diseño para detectar y medir el efecto.

Las pruebas de toxicidad más utilizadas han sido diseñadas en su mayoría para evaluar respuestas de unos pocos individuos de una única especie. El estudio de los impactos de las sustancias químicas sobre la interacción entre especies o sobre la estructura y función de los diferentes ecosistemas, sobre todo acuáticos, ha sido menos desarrollado. Debido a la menor complejidad y mayor facilidad en el desarrollo e interpretación de los resultados de las pruebas de toxicidad en laboratorio y monoespecíficas, se han desarrollado y estandarizado numerosas pruebas de este tipo, sobre todo para especies acuáticas como algas (*Selenastrum capricornutum*) y plantas vasculares (*Lactuca sativa*); dentro de los invertebrados se incluyen crustáceos (*Daphnia magna*, *Hyalella azteca*), larvas de insectos (*Chironomus sp*, *Hexagenia sp*) y bivalvos (*Mysidopsis bahía*); y entre los vertebrados peces (*Pimephales promelas*, *Oncorhynchus mykiss*) y larvas de anfibios (*Lithobates catesbeianus*, *Xenopus laevis*), la gran mayoría del hemisferio norte. También existen especies estandarizadas para ensayos con suelos como invertebrados oligoquetos e insectos.

En Argentina, existen numerosos trabajos que utilizan especies tanto estandarizadas como especies nativas, utilizando adaptaciones de protocolos para especies similares para las que existen protocolos, o bien se desarrollaron protocolos para su utilización como organismos prueba. Ejemplos de ello podemos mencionar el pez *Cnesterodon decemmaculatus* para el cual se han realizado numerosos estudios ecotoxicológicos, evaluando desde su sensibilidad a ciertos metales pesados y plaguicidas hasta su uso para determinar la calidad de cuerpos de agua de la región pampeana, como el Río Reconquista. También existen numerosos bioensayos desarrollados con larvas de anuros de especies neotropicales, como *Hypsiboas pulchellus*, *Rhinella arenarum* y *Scinax squaleirostris* entre otras. Entre los invertebrados podemos mencionar el anfípodo de agua dulce de distribución sudamericana *Hyalella curvispina* utilizado principalmente para la evaluación de sedimentos contaminados.

Cuando se realizan bioensayos de toxicidad existen varios factores que modifican el efecto y en consecuencia los resultados obtenidos. Según Sprague (1995), gran parte de la variación ocurrida en los bioensayos de toxicidad aún no ha podido ser explicada y otra parte de esta variación es adjudicada a factores modificadores relacionados con las variaciones en el diseño experimental. En referencia a los factores modificadores que se relacionan directamente con la biología de los organismos se encuentran: las especies utilizadas como organismos de prueba, su estadio de vida y su tamaño, la nutrición, la salud y el proceso de aclimatación a las condiciones de ensayo. En relación al estadio de vida como factor modificante de respuesta, la información disponible sugiere que la sensibilidad de las especies de invertebrados es dependiente del estado de desarrollo, siendo generalmente más sensibles los estados más inmaduros. El estadio de vida y el tamaño fueron considerados en principio para artrópodos acuáticos, relacionados con el tiempo de muda. Basado en datos de toxicidad de varios compuestos sobre diferentes estados de vida de invertebrados acuáticos, Hutchinson (1998) muestra que, en más de la mitad de los compuestos estudiados, los estados inmaduros son más sensibles que los adultos. Los resultados obtenidos por Muyssen y Jenssen (2007), en estudios sobre *Daphnia magna*, indican sensibilidades iguales o mayores de los estados juveniles comparados con los adultos para zinc

y cobre. Collyard et al. (1994) observaron que la sensibilidad de *Hyalella azteca* para una serie de contaminantes fue similar en organismos de hasta 26 días de edad. En ensayos de toxicidad con sedimentos estandarizados con la misma especie se sugiere la utilización de organismos de diferentes edades: 1 a 3 días de edad, entre <1 y 7 días de edad, o entre 7 y 14 días de edad, u organismos cuya longitud se encuentre entre 2 y 3 mm. La metodología propuesta por USEPA 2000 para ensayos de toxicidad con sedimentos a largo plazo sugiere utilizar organismos de 7 a 8 días de edad.

Cuando se llevan a cabo ensayos de toxicidad es importante utilizar procedimientos estandarizados que permitan una comparación de los resultados obtenidos intra e interlaboratorios. Estas metodologías incluyen la evaluación de tóxicos de referencia sobre especies de prueba estandarizadas, tendiendo a una maximización de la comparabilidad, reproducibilidad y confiabilidad de los datos obtenidos. Por otro lado, los ensayos de toxicidad, exhiben variabilidad, la cual se puede describir a través de dos medidas de precisión: repetibilidad y reproducibilidad de los ensayos de toxicidad. La repetibilidad se refiere a la similitud en los resultados de ensayos repetidos bajo condiciones idénticas, y se puede determinar cuando las varianzas se estiman “dentro” del laboratorio, en repeticiones del mismo operador y con el mismo ensayo y tóxico utilizado. La repetibilidad puede incorporar factores de variación del operador, de muestras de referencia o los organismos prueba. Estas variaciones se pueden disminuir con la realización de ensayos periódicos, a partir de los cuales se genera un seguimiento de la sensibilidad de la especie prueba a un tóxico de referencia, los cuales se pueden representar en una carta control (Figura 12.4.).

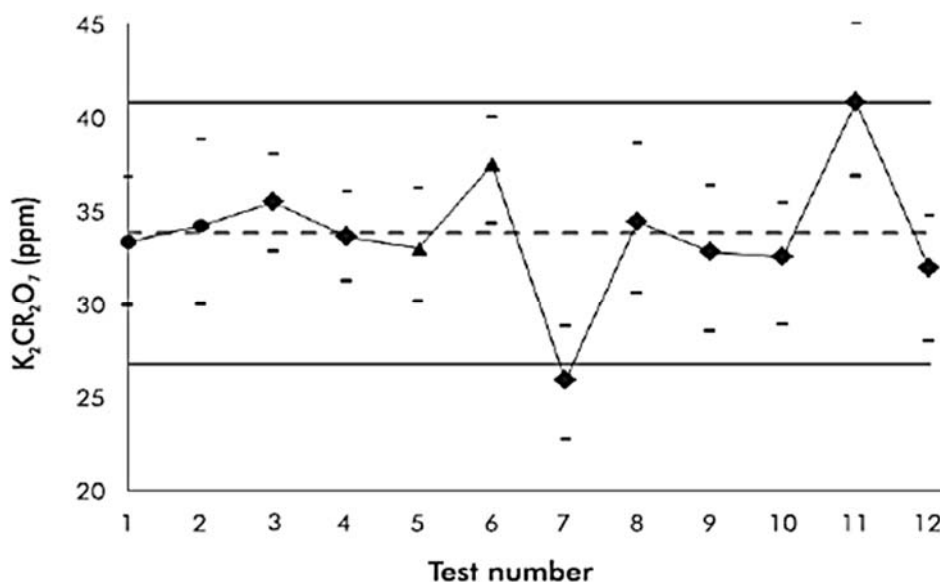


Figura 12.4: Ejemplo de carta control donde se grafican las CL50 (dicromato de potasio en ppm) en ensayos consecutivos a lo largo del tiempo (número de pruebas).

Los compuestos químicos deben tener ciertas cualidades para ser utilizados como tóxicos de referencia. La agencia ambiental canadiense sugiere ciertos compuestos para su utilización en controles de calidad, dentro de los cuales se encuentra el cobre ($CuSO_4$), zinc ($Zn SO_4$) y cromo

(K₂Cr₂O₇) como compuestos inorgánicos y el dodecil sulfato de sodio (SDS) como orgánico. Dichos compuestos son utilizados en ensayos de toxicidad para evaluar las posibles variaciones en la sensibilidad de los organismos utilizados como organismos prueba en el laboratorio, y a su vez se pueden utilizar para verificar la reproducibilidad del método por medio de intercalibraciones.

En las próximas secciones se presentan los diferentes tipos de bioensayos estandarizados para evaluar tanto tóxicos puros como muestras ambientales complejas de cuerpos de agua, incluyendo las dos matrices agua y sedimentos.

Esquema general de bioensayos en laboratorio

Los ensayos de toxicidad en laboratorio pueden ir desde diseños simples y durante un tiempo corto, hasta diseños más complejos a largo plazo, basados en resultados preliminares. Sin embargo, todos siguen un esquema básico de diseño de experimento el cual se muestra en la [Figura 12.5](#), donde los organismos son expuestos a un contaminante (puro, mezclas o muestras ambientales o de procesos) durante un período determinado de tiempo produciendo efectos sobre los mismos a los que denominamos variables de respuesta o puntos finales.

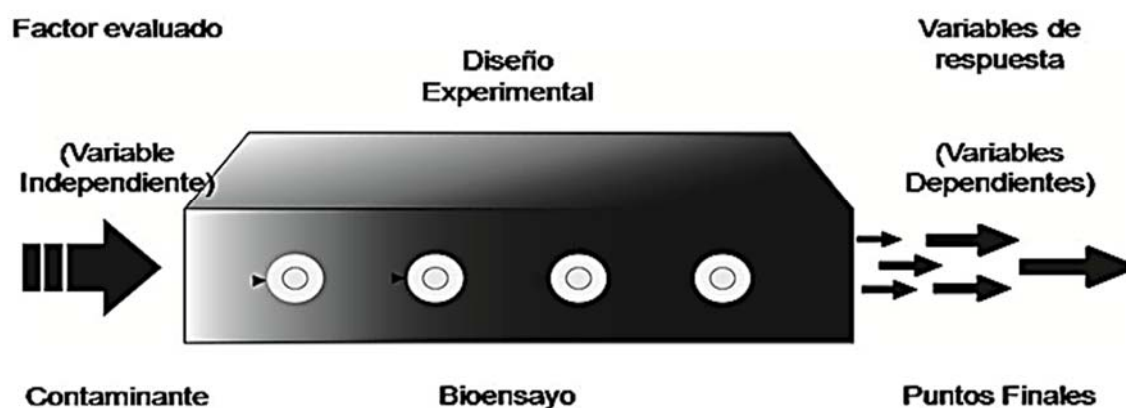


Figura 12.5 Esquema básico de diseño de experimento de un bioensayo de toxicidad

En este esquema general, cada parte del mismo puede tener variaciones, un ejemplo típico puede ser una prueba de toxicidad para evaluar el efecto a corto plazo de un tóxico puro (puede ser un metal pesado o un producto orgánico desarrollado por la industria en etapa de aprobación para su comercialización). La especie prueba seleccionada puede ser el crustáceo *Daphnia magna* y el efecto a evaluar la mortalidad, un ensayo estandarizado y muy comúnmente utilizado en todo el mundo. En líneas generales, los organismos son expuestos en recipientes de ensayo a varias concentraciones del producto a evaluar a las cuales llamamos tratamientos, y al tiempo final de ensayo (en nuestro ejemplo corresponde a 48 horas) se determina la mortalidad y se la compara con el resultado de los organismos de un tratamiento control negativo o blanco, es decir

sin tóxico. Un **control negativo** consiste en un grupo de organismos expuestos a la misma agua de dilución que el ensayo, pero sin la adición del material a evaluar, y en las mismas condiciones y procedimientos. Además, se debe incluir un **control positivo o de referencia**, el cual fue evaluado previamente y a ciertas concentraciones produce el efecto que se está evaluando, en este caso la mortalidad en las 48 horas de exposición.

A partir de este esquema general existen variaciones en relación a las especies prueba, como se mencionó anteriormente y al tipo de material a ensayar, en particular esto depende del objetivo de la prueba. El ejemplo mencionado aplica a ensayos sobre agua dulce, pero de forma similar se pueden ensayar muestras de agua salobre o salada, e incluso sobre otras matrices como sedimentos, los cuales vamos a mencionar en detalle más adelante.

Los bioensayos más desarrollados corresponden a las evaluaciones de sustancias puras en agua o de muestras de cuerpos de agua dulce o marinos, incluidos sus sedimentos de fondo. A continuación, se detallan las principales aplicaciones de los ensayos de toxicidad:

- Para toma de decisiones en los desarrollos de nuevos productos en la industria, los procesos de manufactura y comercialización.
- Para cumplir con los requerimientos regulatorios en el registro de sustancias nuevas.
- Evaluación de la toxicidad de descargas de efluentes de tipo cloacales o industriales
- Evaluaciones de riesgo ecológico.
- Derivación de criterios numéricos para la protección de biota en agua y sedimentos.

En los apartados siguientes se mencionan algunos ejemplos de ensayos de toxicidad tanto en agua como sedimentos, con sus características según el tipo de matriz y objetivos particulares de los mismos.

Ensayos sobre matriz acuosa

Como se mencionó anteriormente, existen protocolos de ensayos desarrollados por organismos nacionales e internacionales, por ejemplo USEPA, ASTM y EC para Norteamérica, OECD para algunos países europeos y en particular para Argentina existen normas IRAM para algunos bioensayos. En todos los casos existen requerimientos básicos para la realización de los mismos, como el tipo y calidad de agua utilizada para los ensayos, la obtención de los organismos de prueba, la forma de exposición y las condiciones de luz y temperatura, y por último la medición de los efectos en los organismos y su análisis e interpretación. Además se deben incluir controles negativos (o de referencia) y positivos para asegurar la calidad de la prueba.

Agua de dilución

La fuente de agua tanto para el cultivo de los organismos prueba como el agua de dilución utilizada en las pruebas de toxicidad depende del objetivo de la misma. Si el objetivo de la prueba

es estimar la toxicidad intrínseca de una sustancia pura, se recomienda utilizar agua reconstituida en laboratorio. Si el objetivo es evaluar la toxicidad, por ejemplo de un efluente, lo más adecuado es utilizar un agua similar a la del cuerpo de agua receptor, se puede obtener de un sitio sin contaminación (sitio de referencia) cercano al sitio de estudio. El agua debe estar presente en grandes cantidades y tener ciertas características en cuanto a su calidad para asegurar el bienestar de los organismos de prueba. En el caso de pruebas a corto plazo y donde se requieran pocas cantidades de agua, se puede utilizar agua reconstituida, por ejemplo en ensayos con microcrustáceos o algas. Pero si se requieren grandes cantidades como por ejemplo ensayos con peces, esta fuente de agua suele ser más difícil de obtener, por lo que se puede utilizar agua de fuentes naturales o agua de red. Esta última, en caso de utilizarse, debe ser adecuadamente decolorada y filtrada según la calidad con que llega desde la red, para evitar compuestos tóxicos o materiales no deseados.

Organismos de prueba

La fuente de organismos para su posterior utilización en ensayos de toxicidad, puede ser a partir de poblaciones naturales o provenientes de cultivos en laboratorio. En este sentido, algunos autores mencionan la historia de la población de donde se extrajeron los animales como un factor que puede modificar la respuesta en ensayos de toxicidad. Aquí estarían involucrados los aspectos de comportamiento y adaptación al medio según los cambios ocurridos en el tiempo, además de considerar que las variaciones geográficas y genéticas de una población dada, conducirían a diferencias en la sensibilidad a los tóxicos. Además, hay que considerar la historia de exposición a contaminantes de la población estudiada, que podría haber sufrido selecciones o impactos en la variabilidad genética. De lo antedicho se desprende la importancia de realizar ensayos de toxicidad utilizando ejemplares obtenidos preferiblemente de cultivos en condiciones controladas de laboratorio, disminuyendo la variabilidad de respuesta y de esta forma poder realizar comparaciones entre resultados.

Como venimos mencionando, es importante utilizar especies de pruebas para las cuales existen protocolos estandarizados. Entre las especies más utilizadas a nivel internacional para realizar bioensayos con agua dulce podemos mencionar el crustáceo *Daphnia magna*, peces ciprinidos como *Pimephales promelas* y la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, especies de algas unicelulares como *Pseudokirchneriella subcapitata*, y semillas de lechuga *Lactuca sativa*. Para realizar ensayos con agua salada, se suelen utilizar las especies de crustáceos *Mysidopsis bahía* o *Paleomonetes sp.*, rotíferos como *Brachionus sp.*, moluscos bivalvos *Mytilus edulis*, especies de anélidos y peces.

Cuando se selecciona una especie nativa como organismo prueba diferente a las incluidas en protocolos estandarizados, se deben tener en cuenta una serie de pautas que indiquen una sensibilidad equivalente a la o las especies recomendadas para el tipo de ensayo en consideración.

Prueba de toxicidad aguda utilizando *D. magna*

Dentro del grupo de los cladóceros, las especies del género *Daphnia* son las más utilizadas como organismos de prueba o de referencia en pruebas de toxicidad. La amplia distribución geográfica, el importante papel que cumplen en la comunidad zooplanctónica, la facilidad en el cultivo en el laboratorio, la reproducción partenogenética (lo que asegura uniformidad de respuesta), y el corto ciclo de vida con la producción de un gran número de crías, hicieron un grupo ideal para la evaluación de toxicidad a nivel universal.

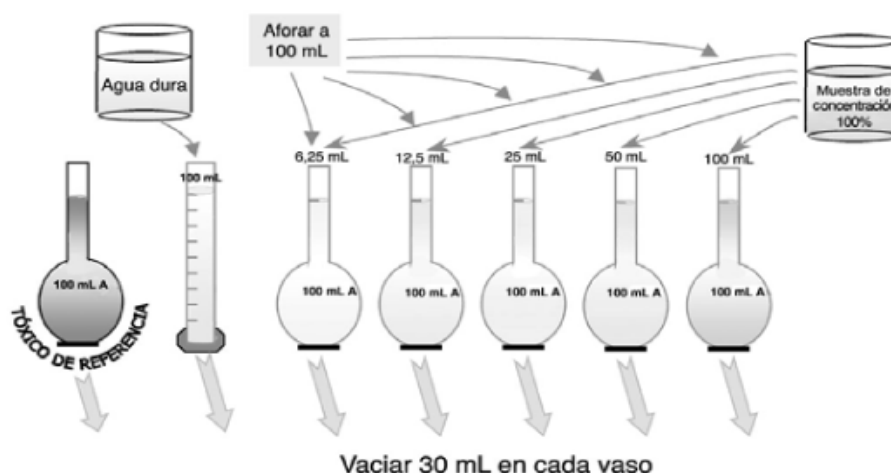
El género *Daphnia* pertenece al orden Cladócera dentro de la clase Crustácea, y las especies *D. magna*, *D. pulex* y *D. similis*, son muy utilizadas en pruebas de toxicidad por lo que existe numerosa información acerca de técnicas de cultivo, requisitos en cuanto a iluminación, temperatura y nutrientes. En particular los ensayos de toxicidad con *D. magna*, permite determinar la letalidad potencial de sustancias puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas y agua de poro de sedimentos.

Para el desarrollo de pruebas de toxicidad aguda (a corto plazo) con esta especie, se utilizan neonatos de menos de 24 horas de nacidos, expuestos a diferentes concentraciones de una muestra o de un agente tóxico durante un período de 48 horas. Como resultado de dicha exposición, se puede determinar la concentración de la muestra o compuesto problema que causa la muerte del 50% de la población de neonatos expuestos (concentración letal media o CL50), con un nivel de confianza del 95%. También pueden determinarse los parámetros NOEC y LOEC.

Cuando se desconocen los rangos de toxicidad de una muestra o compuesto a evaluar, se recomienda realizar una prueba exploratoria, en la cual se prepara un amplio rango de concentraciones sin utilizar replicados (por ejemplo; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 y 100%). Para la prueba se colocan 30 ml de cada una de las diluciones en un vaso de prueba (Polietileno o vidrio) de 50 ml, adecuadamente lavados y acondicionados. Se transfieren 10 neonatos en cada uno de ellos y a las 24 horas se registra el número de organismos muertos. Con esta información podrá establecerse el intervalo de concentración en el cual se puede esperar el 0 y 100% de mortalidad. Este intervalo se utiliza como guía para preparar las diluciones en la prueba definitiva. Para la preparación de las diluciones se utiliza generalmente agua reconstituida (según normas estandarizadas) y se deben determinar los parámetros generales establecidos. También se pueden utilizar agua natural o de red declorinada como se mencionó anteriormente.

Las pruebas definitivas requieren por lo menos 5 diluciones, por lo que es necesario preparar un mínimo de 100 ml por dilución, volumen suficiente para llenar tres replicados para cada concentración. Además de las diferentes concentraciones de la muestra se deben preparar un control negativo solo con agua de dilución y uno positivo con una dilución del tóxico de referencia seleccionado, esta dilución corresponde a la CL50 para dicho compuesto la cual se obtiene de la carta control para la especie. Una vez preparadas las soluciones se transfieren 10 neonatos a cada recipiente. La [Figura 12.6](#) muestra el procedimiento general para llevar a cabo una prueba con *D. magna*.

1 Preparación de diluciones



2 Preparación de prueba

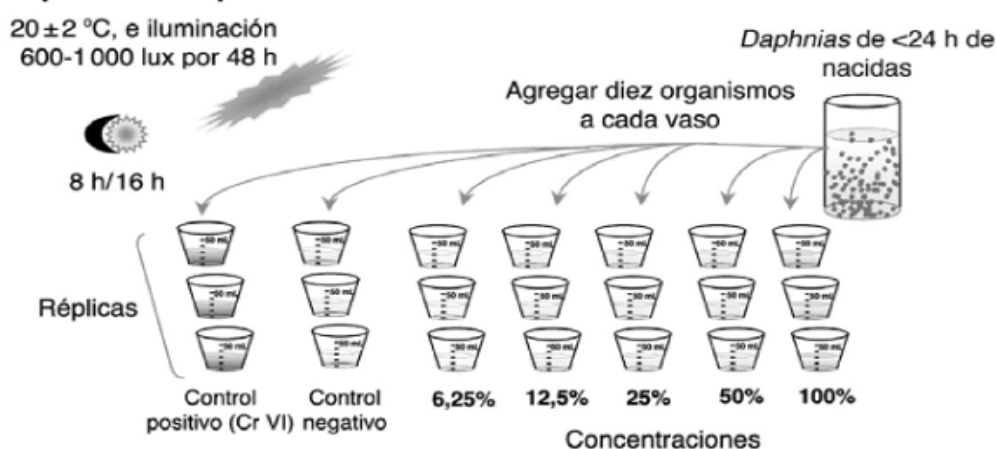


Figura 12.6. Procedimiento general de ensayo de toxicidad con *D. magna*

Finalizada la transferencia de organismos a los recipientes se tapan y colocan en una cámara con temperatura y fotoperíodo controlados durante 48 horas. Transcurrido el tiempo establecido se revisan los recipientes y se contabilizan los organismos muertos en cada uno. La muerte se reconoce por carencia de movilidad o ausencia de ritmo cardíaco. En la [Tabla 12.1](#) se resumen las condiciones generales de la prueba de toxicidad con *D. magna*. En este caso el tipo de ensayo se considera estático ya que no se realiza recambio de soluciones durante el período de exposición.

Existen ciertos requerimientos para que los resultados de la prueba sean aceptables, uno de ellos es que la mortalidad en el control negativo o blanco sea inferior al 10%. Por otro lado la concentración de oxígeno disuelto debe ser mayor a 2 mg/l. Y, por último, en caso de utilizar un control positivo con una concentración cercana a la CL50, los valores de mortalidad obtenidos deberán encontrarse cercanos al 50%.

De forma similar, cada especie protocolizada, tiene sus requerimientos propios para el cultivo y/o mantenimiento en laboratorio, controles de calidad y diseño de experimento, siendo este último de características similares al mencionado para cladóceros cuando se trata de otros invertebrados acuáticos. Para el caso de pruebas con peces, los volúmenes de solución son mayores

y los requerimientos en cuanto a la calidad del agua, diferentes. A su vez, hay ensayos que se realizan con recambios de medio una o dos veces por día, e incluso diseños con flujo continuo del medio de ensayo, lo cual requiere de mayor complejidad en el laboratorio, con mecanismos sofisticados para asegurar dicho flujo en los recipientes de ensayo.

Tabla 12.1: Condiciones de ensayo para la prueba con *D. magna*

Condiciones	
Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	20± 2 °C
Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
Intensidad luminosa	10-20 ±E /m ² / s (800 ± 10% luxes)
Fotoperíodo	16 horas luz : 8 horas oscuridad
Recipientes de prueba	Vasos de 50 ml
Volumen de solución	30 ml
Edad de los organismos prueba	< 24 horas
Número de organismos por vaso	10
Número de réplicas	3
Agua de dilución	Agua reconstituida
Factor de dilución	0,3 o 0,5
Duración de la prueba	48 horas
Efecto medido	Mortalidad (inmovilidad)
Resultado final	CL50
Aceptabilidad de los resultados	Mortalidad en el control negativo <10%

Ensayos con sedimentos

En los ambientes acuáticos el material particulado transporta los compuestos químicos desde la columna de agua hacia los sedimentos de fondo, de esta forma las concentraciones de contaminantes en el sedimento superan a las de la fracción disuelta, tanto para el caso de los metales pesados, como para compuestos orgánicos. En el caso particular de los metales pesados, las concentraciones en sedimentos pueden ser entre tres a seis órdenes de magnitud superiores a las correspondientes a la columna de agua del sitio. Los sedimentos presentan generalmente una mezcla de materiales en términos de sus características físicas, químicas y biológicas. Están constituidos principalmente por cuatro componentes. El agua intersticial o agua de poro, la cual llena los espacios entre las partículas sólidas de la matriz, puede ser mayor al 50% en sedimen-

tos superficiales. El componente inorgánico está constituido por los fragmentos de rocas y minerales producto de la erosión de los materiales terrestres. El componente formado por la materia orgánica ocupa una pequeña fracción en la totalidad de la composición, la conforman mezclas de proteínas, carbohidratos, lípidos y sustancias húmicas. Por último, los materiales derivados antropogénicamente incluyen diversos tipos de contaminantes. Como resultado de este último proceso, algunos sedimentos pueden acumular cantidades significativas de materiales peligrosos, lo cual hace que se consideren contaminados. Un **sedimento contaminado se puede definir como aquel material acumulado en el fondo de cuerpos de agua conteniendo sustancias químicas en exceso, en relación a criterios geoquímicos y/o toxicológicos de calidad**, o que pueden tener efectos adversos en el ambiente o en la salud humana.

La calidad de los sedimentos se ha determinado históricamente a partir de mediciones de la concentración total de los compuestos individuales y comparados con valores de base o de referencia. Sin embargo, la cuantificación de los contaminantes por sí sola no es suficiente para poder determinar posibles efectos adversos sobre los organismos, o la disponibilidad de los diferentes materiales. Las concentraciones de compuestos químicos en los sedimentos pueden ser muy elevadas, pero no tienen una relación directa con la biodisponibilidad. Este es un concepto muy importante en Ecotoxicología, como se mencionó en capítulos anteriores, ya que los tóxicos que no se encuentran biodisponibles, no se encuentran libres para ser incorporados por los organismos y por tanto no causar efectos adversos sobre los mismos.

Geoquímica de los sedimentos y biodisponibilidad de contaminantes

El desarrollo de las pruebas de toxicidad de sedimentos avanzó rápidamente durante las últimas décadas. Los sedimentos en los sistemas naturales a menudo actúan como sumidero de contaminantes ambientales, lo que con frecuencia reduce su biodisponibilidad. La biodisponibilidad se refiere a la fracción de un contaminante presente que está disponible para su absorción por los organismos acuáticos y es capaz de ejercer un efecto tóxico. El grado en que los sedimentos reducen la biodisponibilidad depende de las propiedades físico-químicas del químico y de las propiedades del sedimento. Hay estudios que muestran como las concentraciones químicas que producen efectos biológicos en un tipo de sedimento a menudo no producen efectos en otros, incluso cuando la concentración es un factor de 10 o más. La diferencia se debe a la biodisponibilidad del químico sorbido por sedimentos.

La capacidad de estimar la biodisponibilidad es un factor clave para evaluar en última instancia el peligro de los productos químicos asociados con los sedimentos. Recientemente se ha avanzado mucho en esta área. Ahora se reconoce ampliamente que el contenido de carbono orgánico del sedimento es el principal responsable de controlar la biodisponibilidad de los químicos orgánicos no iónicos (no polares). Este concepto se ha incorporado a un enfoque denominado "Enfoque de equilibrio de partición" y está siendo utilizado por la EPA para establecer criterios de calidad de sedimentos.

Por otra parte, existen numerosos estudios sobre los factores que afectan la capacidad de los sedimentos para captar y concentrar compuestos iónicos, principalmente metales y metaloides

(As, Zn, Cu, Cd, Hg, Pb, entre otros). Las principales variables que determinan la concentración de metales son el potencial “redox”, la granulometría, concentración de coloides (óxidos de Mn, Fe y Al), la concentración de carbono orgánico y sulfuros.

La granulometría del material (tamaño de grano), es un factor importante en la capacidad de retención de los metales. Existe una fuerte correlación positiva entre la disminución del tamaño de grano y la concentración de metales. Esta correlación se debe tanto a factores físicos como mineralógicos (composicionales). Las partículas de arcillas (<2-4 µm) poseen una elevada área específica, determinando reacciones de superficie que favorecen las interacciones de metales con el sedimento. Como consecuencia los sedimentos de grano fino son importantes sumideros de algunos constituyentes inorgánicos.

Algunos procesos químicos que determinan la biodisponibilidad de los metales en los sedimentos están controlados directa o indirectamente por el nivel de oxígeno de la matriz. En sedimentos de fondo aeróbicos, la presencia de hidróxidos de hierro, manganeso, aluminio y el carbono orgánico tienden a disminuir la biodisponibilidad de metales. Se encontraron correlaciones negativas entre el contenido de carbono orgánico en el sedimento, los efectos tóxicos y la bioacumulación de metales en organismos expuestos. Ello muestra una disminución de la fracción de metal disponible para el ingreso a los organismos.

En sedimentos anóxicos, la biodisponibilidad de algunos metales (cadmio, cromo, níquel, plomo y zinc), estaría regulada por la concentración de sulfuros, la presencia de cantidades lo suficientemente elevadas promueven la formación de sulfuros metálicos, de muy baja solubilidad. Consecuentemente, los niveles de metales disueltos en el agua intersticial se mantienen bajos, disminuyendo así su disponibilidad. De esta manera, el tratamiento de los sedimentos con ácidos débiles permite la formación de sulfuros ácidos volátiles (AVS) y la extracción simultánea de metales (SEM), parámetros utilizados como una medida de biodisponibilidad. Di Toro et al. (1992), argumentan que para valores de SEM/AVS menores a 1, los metales precipitan como sulfuros, disminuyendo su potencial tóxico para las especies bentónicas.

Estrategias de evaluación de efectos de sedimentos contaminados

La complejidad que presenta la distribución de contaminantes, nutrientes y otras características del sedimento hacen que las determinaciones de los efectos de los contaminantes sobre la biota asociada a los mismos sean muy complejas, pero no imposible. Esto genera que la evaluación de dichos efectos se lleve a cabo a partir de un enfoque integrado, es decir con información proveniente de diferentes “líneas de evidencia”. Para las evaluaciones de los sedimentos se han generado y aplicado metodologías que incluyen la medición de contaminación en la matriz, la evaluación de efectos biológicos con bioensayos de toxicidad (en laboratorio o in situ), el empleo de biomarcadores, la medición de residuos de contaminantes en tejidos de organismos y la utilización de índices biológicos sobre las comunidades bentónicas. La forma más difundida de evaluación es la comparación con niveles guías de calidad.

La necesidad de contar con reglamentaciones que asistan la gestión de control ambiental, se han ido generando valores numéricos de concentraciones de referencia para la evaluación de la

peligrosidad de sedimentos. Por tal motivo diferentes agencias y países han desarrollado y propuesto niveles guía de calidad de sedimentos (NGCS) (incluyendo criterios, objetivos y/o estándares de calidad). Cuando se derivan niveles guía, se trabaja sobre los supuestos de que dichos valores pueden ser utilizados como medidas directas de los efectos potenciales de la contaminación en sedimentos sobre los organismos bentónicos. Si bien estos niveles pueden ser muy útiles para determinar si la concentración de determinado compuesto excede el umbral de toxicidad aguda o crónica, los sedimentos suelen estar contaminados con mezclas de contaminantes. Una de las desventajas de la utilización de niveles de referencia es que no se tiene en cuenta la biodisponibilidad. Se plantean una serie de incertidumbres a la hora de utilizar estos valores en las evaluaciones ambientales, en general asociadas a la capacidad que tienen los mismos para predecir presencia o ausencia de toxicidad, o establecer relaciones causa-efecto. Por tal motivo, se necesitan otras herramientas para incorporar los riesgos para los organismos bentónicos asociados a la exposición a sedimentos contaminados. Un ejemplo es, precisamente, el empleo de información ecotoxicológica.

Una forma de realizar evaluaciones de sedimentos ampliamente difundida es la Triada de Calidad de Sedimentos (sigla en inglés SQT). Dicha metodología fue aplicada por primera vez en Puget Sound (EEUU de Norteamérica) por Long y Chapman (1985) y luego fue muy utilizada en numerosas evaluaciones de ambientes marinos y de agua dulce de Norte América, Europa y Sudamérica, principalmente en Brasil. La tríada de calidad de sedimentos provee diferentes líneas de evidencia que incluyen, contar como mínimo, con la concentración de contaminantes en el sedimento, la toxicidad asociada y la composición de la comunidad bentónica correspondiente al ambiente en particular. También se suelen incluir concentraciones de contaminantes en el tejido de los organismos para determinar procesos de bioacumulación y biomagnificación.

Por tanto, el grado de contaminación de un sitio en particular se evalúa generalmente comparando los niveles de contaminantes medidos, la descripción de las comunidades bentónicas, y bioensayos de toxicidad en campo (in situ) o en condiciones de laboratorio, comparando sedimentos del sitio a ser evaluado con los provenientes de sectores no contaminados del área, cuando esto es posible. Los diferentes sedimentos utilizados en las comparaciones se denominan prueba, control y de referencia. Se considera un **sedimento prueba** al sedimento cuya calidad quiere ser evaluada, o sedimento problema. Para poder realizar controles de calidad de la herramienta de diagnóstico, se trabaja con un **sedimento control**, el cual debe provenir de un sitio prístino, no contaminado, que debe garantizar la supervivencia y desarrollo normal de los organismos prueba. Este sedimento puede ser también formulado artificialmente. Un **sedimento de referencia** también se puede obtener de un sitio que presente un nivel bajo o moderado de contaminantes, los cuales representan los niveles de base de contaminación en el área de estudio. Este debe ser lo más parecido posible en sus características fisicoquímicas al sedimento prueba.

Bioensayos con sedimento directo

Los ensayos de toxicidad en laboratorio para evaluar efectos de contaminantes asociados a los sedimentos utilizan diferentes organismos que incluyen algas, bacterias, moluscos, anélidos,

insectos, crustáceos y peces. Para la evaluación de contaminación se pueden utilizar **cuatro fases del sedimento**, que reflejan diferentes condiciones de exposición a los tóxicos en las pruebas de toxicidad. Los bioensayos sobre **agua de poro** (agua intersticial) proveen información sobre la toxicidad de las sustancias disueltas en la fase acuosa. Los **eluriados/elutriados** de sedimentos pueden dar información sobre los efectos tóxicos potenciales de los contaminantes sorbidos a las partículas de sedimentos. Los bioensayos con **sedimento completo** proveen una metodología que permite evaluar la biodisponibilidad de los contaminantes para los organismos bentónicos. Por último la exposición de los organismos a **extractos orgánicos** a partir del sedimento, constituyen el peor escenario de exposición, ya que hacen más biodisponibles a compuestos lipofílicos.

La elección del nivel biótico y el tipo de ensayo de toxicidad (fase del sedimento empleada), se basa principalmente en los objetivos de estudio y en variables referidas a la factibilidad en la realización de los ensayos (costos, practicidad, etc.). Esto influye en la elección de ensayos empleando solo un nivel biótico. La mayor cantidad de trabajos relacionados con la evaluación de sedimentos de muestras ambientales se realizan con especies pertenecientes a un nivel biótico, lo contrario a lo que ocurre en ensayos aplicados a las evaluaciones del medio líquido. A su vez todas las fases del sedimento deberían ser evaluadas con una batería de ensayos para tener un mejor conocimiento de la toxicidad total del sedimento. Sin embargo se suelen seleccionar no más de dos fases, de acuerdo con la capacidad de cada laboratorio para la realización de los ensayos. Los organismos más utilizados corresponden a invertebrados bentónicos, esto se relaciona con el hecho de que la fase más empleada para conducir ensayos de toxicidad sea el sedimento completo.

Dentro de los invertebrados, los organismos de agua dulce más utilizados en las evaluaciones de la toxicidad de sedimentos incluyen las siguientes especies bentónicas y de la columna de agua (algunos ya mencionados en el apartado 2.1): *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales pomelas*, *Hyalella azteca*, *Chironomus tentans*, *C. riparius*, *Hexagenia limbata* y *Tubifex tubifex*. Para dichas especies se encuentran disponibles protocolos estandarizados por diferentes organismos internacionales, los cuales fueron mencionados anteriormente. En Argentina y Latinoamérica en general, debido a la ausencia de planes de gestión y de protocolos nacionales para la realización de bioensayos de toxicidad, las evaluaciones de ambientes contaminados se realizan con criterios poco unificados en lo referido al tipo de matriz utilizada, puntos finales de evaluación y principalmente no se han desarrollado metodologías validadas que contemplen la utilización de especies nativas en dichas evaluaciones. Sin embargo, en los últimos años se ha comenzado a emplear el anfípodo de distribución Sudamericana *H. curvispina* como organismo prueba en evaluaciones ecotoxicológicas. Esta especie se ha venido utilizando para evaluar tanto muestras ambientales de sedimentos en laboratorio como para evaluar la toxicidad de tóxicos puros adicionados a dicha matriz (sedimentos naturales o artificiales).

Ensayo de toxicidad con sedimento directo utilizando *H. curvispina*. Es un método para la determinación de la toxicidad en juveniles de *Hyalella curvispina* en el sedimento completo, a

través de la evaluación de la sobrevivencia y la inhibición del crecimiento después de 10 d, y/o 28 días. Este método es aplicable a:

- a) muestras de sedimentos de agua dulce contaminadas;
- b) barros de origen industrial o municipal, u otros residuos sólidos que se pueden diluir con sedimentos de agua dulce, y;
- c) sustancias químicas y/o preparaciones adicionadas a sedimentos no contaminados.

En términos generales se exponen juveniles de *Hyalella curvispina* de 3 mm a 5 mm de longitud total y de ser posible con edades que no difieran en más de dos días, en grupos de 10 organismos en un sedimento contaminado o un sedimento adicionado con sustancia química por 10 y/o 28 días. Los puntos finales para el ensayo son sobrevivencia y crecimiento, evaluados en relación con organismos expuestos en paralelo al sedimento control. El ensayo se realiza en recipientes de vidrio o polipropileno con la proporción de sedimento en agua (volumen: volumen) entre 1:1,75 o 1:4 (por ejemplo 100 ml de sedimento con 175 ml de agua sobrenadante o 100 ml de sedimento con 400 ml de agua sobrenadante) con diez individuos por recipiente.

Colecta y mantenimiento de muestras de sedimento: cuando se trabaja con muestras ambientales es importante seguir ciertas normas de obtención de las mismas y su mantenimiento en el laboratorio. Es importante coleccionar muestras de sitios de referencia además de los sitios a evaluar. Una vez obtenida la muestra de los primeros cm del sedimento de fondo, debe ser inspeccionada para quitar restos de material vegetal macroscópico y biota asociada a los mismos, luego se debe homogeneizar y preservar preferentemente en oscuridad a 4 °C.

Desarrollo de la prueba: La muestra de sedimento se homogeniza 24 horas antes del inicio del bioensayo (día -1) y se dispone una alícuota en cada uno de los recipientes (aproximadamente 100 ml). Se distribuye el sedimento de ensayo en una capa uniforme, que permita a los anfípodos excavar. Se preparan entre 5 y 8 réplicas de laboratorio para cada tratamiento o muestra de ensayo y cada período de ensayo (por ejemplo, 10 d y 28 d). Se pueden utilizar una o más réplicas por tratamiento para controlar las características químicas del sedimento y el agua sobrenadante durante el ensayo. Las réplicas establecidas para el seguimiento de las sustancias químicas deben recibir a los anfípodos, como en las otras réplicas de ensayos. Se alisa la superficie del sedimento en forma plana en cada recipiente y se asegura que haya una perturbación mínima del sedimento control y de ensayo durante la adición del agua sobrenadante. Se inicia el ensayo de toxicidad ubicando diez individuos de *H. curvispina* en cada recipiente de ensayo. El agua sobrenadante tanto del sedimento control como de los sedimentos de ensayo puede deteriorarse o contaminarse debido a los niveles naturales de amoníaco o por la acumulación de amoníaco proveniente del alimento no comido. Por este motivo a pesar de que el ensayo descrito en esta norma es principalmente un ensayo estático, la renovación del agua sobrenadante puede ser necesaria en forma intermitente. Al final del ensayo (10 d o 28 d), se tamiza el contenido de cada recipiente de ensayo a través de una malla de 300 µm para remover los organismos de ensayo y determinar si están muertos o vivos. Se puede además usar el agua sobrenadante

para el tamizado. Se determinan el número total de anfípodos vivos y muertos. Algunos organismos de ensayo pueden morir tempranamente y sus cuerpos desintegrarse hacia el final del ensayo. Los animales se consideran muertos si no se observan movimientos en respuesta a un estímulo mecánico. La [Tabla 12.2](#) muestra las condiciones de ensayo recomendadas para el desarrollo de la prueba, las mismas fueron tomadas del protocolo estandarizado para *H. azteca* por la EPA, y modificada y adaptada para la especie nativa *H. curvispina*.

Tabla 12.2: Condiciones de ensayo a 10 días con sedimento directo utilizando *H. curvispina*

Condiciones	
Temperatura	21 ± 1 °C
Fotoperíodo	16:8 horas luz/oscuridad
Renovación	Con renovación parcial (60 %) cada 24 h
Recipientes	Plásticos de 500 cm ³ de capacidad
Volumen de sedimento	100 ml
Volumen de agua	175 ml
Agua sobrenadante	Agua no clorada de red (agua de cultivo de <i>H. curvispina</i>)
Nº de organismos	10 por recipiente
Replicados	5 por concentración
Alimentación	Lechuga procesada cada tres días
Aireación	Sin aireación
Duración	10 días
Punto final	Supervivencia y crecimiento
Aceptabilidad	80 % supervivencia en controles negativos

La metodología de ensayo mencionada se puede aplicar con diferentes objetivos como se mencionó anteriormente. Uno de ellos suele ser la evaluación del comportamiento de ciertos tóxicos en el sedimento y cómo las diferencias en las características de la matriz pueden afectar su biodisponibilidad. Un ejemplo de ello es un estudio realizado para evaluar la influencia de la materia orgánica (MO) en la toxicidad y biodisponibilidad del mercurio en muestras de sedimentos en el anfípodo *Hyalella curvispina*, evaluando la supervivencia y el crecimiento bajo exposición crónica. La sensibilidad de la especie en las pruebas en ensayos con agua fue LC-50 de 96 h 0.025 mg/L de Hg. Sin embargo, cuando se realizaron ensayos con sedimentos adicionados con dicho metal en un rango de concentraciones entre 1 y 10 mg/kg (peso seco) a sedimentos con diferentes contenidos de materia orgánica (MO), los resultados indican que los sedimentos con MO no indujeron letalidad bajo concentraciones de mercurio de hasta 10 mg/kg (peso seco). Por el contrario, los organismos expuestos a sedimentos sin MO se vieron significativamente afectados a la mitad de la concentración de ese metal. Los efectos sub-letales fueron evidentes a 3 mg/kg. La presencia y la proporción de

MO en el sedimento influyen claramente en la biodisponibilidad del mercurio, afectando la toxicidad en un nivel diferente según el punto final que se evalúa.

Por otra parte, los bioensayos con sedimentos, son muy utilizados para evaluar la calidad de cuerpos de agua con diferentes tipos de impacto. Un ejemplo es un estudio realizado sobre el Río Luján, provincia de Buenos Aires, donde se evaluaron sedimentos de fondo de 14 sitios situados a lo largo de su curso, donde se realizó una caracterización físico-química y además, se realizaron pruebas de toxicidad de laboratorio con sedimento completo (10 días de exposición) con cada muestra, utilizando el anfípodo *H. curvispina* como organismo prueba. El perfil físico-químico de las muestras resultó similar a lo largo del curso del río, aunque se registraron varios datos anómalos en el curso medio del río, principalmente en muestras tomadas aguas abajo de un gran complejo industrial. Casi el 50% de las muestras indujeron efectos adversos en el anfípodo al evaluar los puntos finales subletales y letales. La toxicidad de las muestras en términos de tasa de supervivencia fue extremadamente alta en dos sitios, en particular en muestras tomadas aguas abajo del complejo industrial Pilar. La integración de una selección de parámetros físicoquímicos y toxicológicos de los sedimentos permitió discriminar áreas de la cuenca del río según el tipo y la intensidad de su condición particular de contaminación.

Batería de Bioensayos e índices ecotoxicológicos

La determinación de contaminantes en mezclas complejas de composición desconocida, una situación común con efluentes tanto líquidos como sólidos, no permite una buena estimación de la toxicidad. Para tales muestras, el enfoque basado en la evaluación de la toxicidad generalmente se reconoce como el mejor método para evaluar una toxicidad potencial. La principal ventaja de realizar bioensayos es su carácter integrador. De hecho, integran los efectos de todos los contaminantes, incluidos los efectos aditivos, sinérgicos y antagonísticos. Proporcionan información valiosa sobre la fracción biodisponible de los contaminantes solamente; y a su vez integran los efectos de todos los contaminantes, incluidos los no considerados o detectados por análisis químicos.

Los organismos para evaluar la toxicidad son diversos en su composición y su sensibilidad a los tóxicos; por lo tanto, a menudo se usa una **batería de bioensayos** en lugar de una sola especie para cubrir una amplia gama de sensibilidades. Los organismos de prueba incluidos en una batería incluyen representantes de la cadena alimentaria a nivel de consumidores, productores y descomponedores. Los criterios para la selección de la batería incluyen poblaciones autóctonas, en particular aquellas que son ambientalmente atractivas, con una distribución amplia y fácil de mantener en el laboratorio. A su vez, existen índices para resumir en un único valor los resultados de múltiples pruebas. Un ejemplo es el índice EDAR (Ronco et al., 2005) para categorizar efluentes. Este índice utiliza la concentración de la muestra para cada prueba que induce un efecto del 20%, considerando el LC/IC /EC20. Cuando no es posible determinar un LC/IC/EC20, se usa la dilución más alta que muestra un efecto tóxico del 15% o más, o la muestra

no diluida (100%) cuando las respuestas tóxicas a esta concentración son inferiores al 15%. Las diluciones que producen un efecto 100% tóxico no se utilizan en el cálculo del índice.

En el caso de evaluación de la toxicidad de sedimentos, se suelen utilizar diferentes fases del mismo para aplicar una batería de pruebas, por ejemplo se ensayan elutriados o agua de poro además del sedimento directo, utilizando especies de algas, cladóceros y peces para las fases líquidas y anfípodos para el sedimento completo. De esta forma están siendo evaluadas todas las rutas de exposición y los diferentes niveles tróficos de la biota.

A su vez, para evaluar la peligrosidad relativa de sedimentos (categorización), se pueden utilizar índices, mediante los cuales se logran unificar resultados de múltiples bioensayos de toxicidad, junto a información fisicoquímica, en un único valor.

Bibliografía

- APHA, AWWA, WEF, (1998). Standard methods for examination of water and wastewater, American Public Health Association, Washington DC.
- ASTM. (1994). American Society for Testing and Materials: Standard guide for designing biological tests with sediments. ASTM E 1521-94, Philadelphia.
- Blaise, C. & Féard, J.-F (eds.), (2005). *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*, Vol. 2. Springer.
- Burton, E., Phillips, I., Hawker, D. (2006). Factors controlling the geochemical partitioning of trace metals in estuarine sediments. *Soil Sediment Contamination*, 15:253-276.
- Chapman, P. M., Wang, F., Janssen, C., Persoone, G., Allen, H. E. (1998). Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 55(10):2221-2243.
- Díaz Baéz, M.C., Pica Granados, Y., Ronco A.E. (2005). Bioensayo de Toxicidad Aguda con *Daphnia magna*, pp 52-63. *Metodologías Bioanalíticas de Control de Calidad de Agua. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones*, Instituto Mexicano de Tecnología del Agua y International Research Development Centre IDRC, 2005, ISBN 968-5536-33-3.
- EC, Environment Canada, (1999). Guidance Document on Application and Interpretation of Single-Species Tests in Environmental Toxicology. Method Development and Application Section. Environment Technology Centre. Report: EPS 1/RM/34
- Finney, D.J. (1971). *Probit analysis*. Third edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hutchinson, T.H., Solbe, J., Kloepper-Sams, P.J. (1998). Analysis of the ecotoxic aquatic toxicity (EAT) database III- Comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms. *Chemosphere*, 36(1): 129-142.
- IRAM. (2003). Norma Argentina, Calidad ambiental y Calidad del agua de muestreo. Parte 16: Guía para el bioensayo de muestras. IRAM 29012-16:2003.

- Long, E.R., Chapman, P.M. (1985). A sediment quality triad measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition in Puget Sound. *Marine Pollution Bulletin*, 16: 405-415.
- Muyssen, B.T., Janssen, C.R. (2007). Age and exposure duration as a factor influencing Cu and Zn toxicity toward *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68(3): 436-42.
- Natale, G.S., Ammassari, L.L., Basso N.G., Ronco, A.E. (2006). Acute and chronic effects of Cr(VI) on *Hypsiboas pulchellus* embryos and tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms*. 72:261-267.
- Newman, M.C., Clements, W.H., (2008). *Ecotoxicology: A Comprehensive Treatment*. Taylor & Francis Group.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). (2004). *Daphnia* sp., acute immobilisation test. Guideline for testing of chemicals No. 202, Organization for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). (2004). Sediment-Water Chironomid toxicity test using spiked sediment. Guideline for testing of chemicals No. 218, Organization for Economic Co-operation and Development, Paris .
- Peluso, L., Giusto, A., Bulus Rossini, G.D., Ferrari, L., Salibián, A., Ronco, A.E., (2011). *Hyalella curvispina* (Amphipoda) as a test organism in laboratory toxicity testing of environmental samples. *Fresenius Environmental Bulletin*, 20, 372–376.
- Peluso, L., Bulus Rossini, G., Salibián, A., Ronco, A.E., (2013). Physicochemical and ecotoxicological based assessment of bottom sediments from the Luján River basin, Buenos Aires, Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185, 5993–6002.
- Peluso, M.L., Salibián, A., Ronco, A.E., (2013). Toxicity and bioavailability of mercury in spiked sediments on *Hyalella curvispina* Shoemaker, 1942. *International Journal of Environmental Health*, 6, 224–234.
- Rand, G. M., Wells, P. G., McCarty, L. S. (1995). Introduction to aquatic toxicology. In: Rand, G. M. (eds) *Fundamental of aquatic toxicology*. Taylor and Francis, Washinton, DC. Pages: 3-66.
- Ronco, A.E., Sobrero, C., Grassi, V., Kaminski, L., Massoio, L., L. Mina. (2000). Watertox bioassay intercalibration network: results from Argentina. *Environmental Toxicology*, 287-297.
- Simpson, S.L., Batley, G.E., Chariton, A.A., Stauber, J.L., King, C.K., Chapman, J.C., Hyne, R.V., Gale, S.A., Roach, A.C., Maher, W.A. (2005). *Handbook for Sediment Quality Assessment*. CSIRO: Bangor, NSW.
- USEPA, United States Environmental Protection Agency. (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, 5th ed. USEPA, Washington (EPA-821-R-02-012). Test Method 2000.0.
- USEPA. United States Environmental Protection Agency. (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates Second Edition. Office of Science and Technology Office of Water. Report: EPA 600/R-99/064.
- Wright, D.A., Welbourn, P. (2002). *Environmental toxicology*. Cambridge University Press

CAPÍTULO 13

Biomarcadores de Contaminación

Jimena Cazenave, María V. Amé, Mirta L. Menone

Inicialmente, los biomarcadores fueron desarrollados en el campo de la biología humana para brindar diagnósticos tempranos de patologías o para determinar las respuestas del organismo a diferentes tratamientos. En este contexto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define a un biomarcador como cualquier medición que refleje una interacción entre un sistema biológico y un peligro potencial que puede ser químico, físico o biológico (WHO, 1993).

Por su parte, desde el campo de la Ecotoxicología, los biomarcadores se definen como cambios en una respuesta biológica que puede relacionarse con la exposición o los efectos tóxicos de químicos ambientales (Peakall, 1994). Estas respuestas pueden medirse a distintos niveles de organización subindividual (molecular, celular, fisiológico, incluyendo cambios conductuales) y deben demostrar una desviación del estado normal (Walker et al., 2001). Así, los biomarcadores se pueden utilizar tanto para detectar una exposición (biomarcadores de exposición) como para determinar sus consecuencias biológicas adversas (biomarcadores de efecto). También, los biomarcadores pueden denotar la susceptibilidad particular de unos organismos respecto a otros de ser afectados con mayor adversidad por determinados contaminantes. La importancia de su uso reside, entonces, en su habilidad para proveer un sistema de alerta temprano, a nivel de organismo, antes de que ocurran cambios a niveles de organización mayores (población, comunidad, ecosistema). Además, los biomarcadores podrían servir para evaluar cambios o mejoras en un ambiente, posterior a un proceso de remediación.

En la literatura, el criterio de clasificación de los **biomarcadores** es variado. Una de las más frecuentes, es aquella que los agrupa en tres categorías: de **exposición**, de **efecto** y de **susceptibilidad** (van der Oost et al., 2003). Por otro lado, teniendo en cuenta su respuesta frente a los xenobióticos, los biomarcadores pueden categorizarse como específicos y no específicos. Sin embargo, en ciertos casos la clasificación de algunos biomarcadores se vuelve difusa ya que se distinguen por la forma en que son usados, y no por una dicotomía inherente.

Criterios para definir un biomarcador óptimo

Para que un parámetro biológico pueda ser considerado como biomarcador debe seguir ciertos criterios básicos como los establecidos por Huggett et al. (1992):

- Indicador general. Cuando un biomarcador presenta capacidad de responder a una variedad de químicos contaminantes diferentes, podrá utilizarse como un indicador general de exposición a mezclas de contaminantes y podrá aplicarse a los estudios de “screening”. *Ejemplo:* Concentración o cantidad de adenosina trifosfato (ATP), que es una medida de la energía metabólica disponible. La disminución de la concentración de ATP ante la exposición a algunos contaminantes es un parámetro no específico, pero brinda información sobre la tasa de crecimiento de un organismo.
- Sensibilidad relativa. Un biomarcador sensible responderá antes de que se manifiesten indicadores tradicionales de toxicidad, tales como la letalidad u otros efectos deletéreos. Esta respuesta temprana de los biomarcadores sensibles es esencial para poder predecir riesgos y definir un sistema de alerta eficiente. En este sentido, resulta también muy útil que el biomarcador elegido muestre una fuerte dependencia tanto de la concentración de los contaminantes como del tiempo de exposición a ellos, lo cual permitirá una predicción del riesgo poblacional muy precisa. *Ejemplo:* La actividad de la enzima ácido-δ-aminolevulínico deshidratasa (ALAD), que es específicamente inhibida por el plomo, es tan sensible que los resultados obtenidos en tales estudios podrían ser suficientes para remplazar el análisis químico en las muestras ambientales.
- Especificidad biológica y química. La especificidad biológica se refiere a que el biomarcador pueda tener mayor aplicación en ciertos grupos de organismos debido, por ejemplo, a su capacidad metabólica diferente. La especificidad química involucra una respuesta a determinados químicos o clases de ellos y no a otros. *Ejemplos:* La eficiencia de las enzimas de detoxificación generalmente es menor en invertebrados respecto a vertebrados (especificidad biológica); las proteínas denominadas metalotioneínas han sido tradicionalmente específicas en el secuestro de metales pesados, principalmente de cadmio y zinc (especificidad química).
- Permanencia de la respuesta: Dependiendo de la escala temporal deseada en el estudio, la reversibilidad puede ser importante, es decir, se refiere a si la respuesta es transitoria o permanente. *Ejemplo:* Generalmente los biomarcadores de daño como los histológicos, son permanentes y, en cambio, algunas enzimas como las antioxidantes son reversibles debido a su comprobada recuperación a valores basales cuando cesa la exposición de los organismos.
- Vinculación a efectos en niveles de organización superior: una respuesta molecular o bioquímica es más relevante cuando su significancia biológica se puede vincular claramente al crecimiento o la reproducción. Su falta de vinculación no invalida el uso del parámetro en cuestión como un biomarcador, pero limita su potencial predictivo. *Ejemplo:* El índice mitótico de los ápices radicales en plantas es un parámetro citológico que se vincula directamente al crecimiento del individuo, siendo entonces un biomarcador a nivel celular que puede vincularse al nivel de organización organismo. Más deseable aún sería un parámetro capaz de indicar cambios a nivel de organización poblacional.

- Aplicación y validación en el campo. Algunos parámetros no pueden ser fácilmente medidos en estudios de campo y aquellos que sí se han aplicado y su respuesta es similar a la observada en laboratorio, podrían considerarse validados. *Ejemplo:* La actividad de las enzimas de biotransformación de fase I, tales como las del citocromo P450, se ha validado en estudios de campo con peces expuestos a diferentes hidrocarburos contaminantes.
- Consideraciones metodológicas. La variabilidad es por un lado inherente a toda la naturaleza, pero también se debe tener en cuenta la influencia de factores fisiológicos o ambientales en la respuesta de un organismo a un tóxico. Las respuestas de los biomarcadores pueden ser confundidas por factores bióticos y abióticos, lo cual complica la interpretación de los datos ya que la inducción de una respuesta podría deberse a factores no relacionados con la exposición al contaminante. Por otra parte, deben considerarse la reproducibilidad en términos metodológicos y el costo implicado en las mediciones. En este sentido, se desaconsejan aquellos biomarcadores cuya medición sea demasiado costosa, demande demasiado tiempo o implique técnicas muy sofisticadas. *Ejemplo:* Es deseable que un parámetro no sea altamente variable, estudios realizados en nuestros laboratorios demuestran que los parámetros de genotoxicidad tales como micronúcleos no son tan variables como las actividades de enzimas de detoxificación y antioxidantes, además de la ventaja de ser los primeros de muy bajo costo.
- Preservar a los organismos: Un biomarcador ideal debiera ser no destructivo, ello refiere a que su evaluación no requiera del sacrificio de los organismos. Muestras de sangre, pelo, piel y pequeñas porciones de otros tejidos suelen ser una opción para la determinación de biomarcadores no destructivos. Por ejemplo, la determinación de genotoxicidad mediante la frecuencia de micronúcleos (ver Capítulo 7) en eritrocitos nucleados de peces, anfibios, reptiles o aves, puede realizarse tomando una muestra de sangre sin la necesidad del sacrificio de los organismos. Por otra parte, la determinación de enzimas de detoxificación hepática requiere por lo general de la extracción del órgano, lo cual implica el sacrificio de los individuos. Otros como la enzima acetil colinesterasa (AChE) pueden ser destructivos si se analizan en el tejido nervioso, pero no destructivos si se miden en los glóbulos rojos de una muestra de sangre.

Algunos ejemplos de biomarcadores

Bioacumulación

Los biomarcadores de exposición incluyen la detección y medición de una sustancia exógena, o de sus metabolitos, o del producto de la interacción entre un agente xenobiótico y alguna molécula o célula blanco, que se miden en un organismo expuesto. Además, proporcionan información sobre la relación entre el medio externo (exposición) y el medio interno (medición de la acumulación) y acerca de su distribución en el organismo. Si bien detectar contaminantes en los

organismos permite comprobar la exposición a un compuesto químico, no necesariamente provee información sobre su significancia toxicológica. Por otra parte, la metodología para medir estos biomarcadores suele ser trabajosa y de alto costo, requiriendo además un operador con experiencia en el procedimiento. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado la exposición a contaminantes ambientales de diversa naturaleza en Argentina. Así, en peces recolectados en el río Suquía (Córdoba), se detectaron al menos una vez los 20 productos farmacéuticos analizados en muestras de *Jenynsia multidentata* (n. v.: madrecita) y *Gambusia affinis*. Siete de estos 20 compuestos se detectaron en todas las muestras analizadas (Valdés et al., 2016). En peces recolectados en los ríos Paraná y Acaraguá (Misiones) se detectaron no sólo productos farmacéuticos, sino que también se demostró la exposición a drogas ilícitas (Ondarza et al., 2019). El avance de la metodología analítica, como la espectrometría de masas de alta resolución en conjunto con nuevas propuestas en la interpretación de espectros de masa, se postulan como herramientas muy prometedoras para identificar compuestos "no-objetivo" (analitos conocidos, aunque no buscados a priori, o bien analitos completamente desconocidos). La bioacumulación y los factores que pueden modificarla se discuten con detalle en el Capítulo 3.

Biotransformación

Una vez que un contaminante químico ingresó a un organismo puede ser excretado como tal, es decir, con su estructura química original (compuesto parental) o ser biotransformado. Las reacciones de biotransformación generalmente conducen a la formación de un compuesto más hidrofílico que se excreta más fácilmente que el compuesto original. Idealmente, los metabolitos generados pueden tener también menor toxicidad (detoxificación). Sin embargo, se conoce que algunos compuestos químicos son convertidos a metabolitos de mayor reactividad (bioactivación), como es el ejemplo del plaguicida clorpirifós. Las reacciones de metabolización son catalizadas por enzimas presentes principalmente en el hígado, sin bien se ha reportado una actividad importante en otros tejidos como cerebro e intestino. Las plantas utilizan el mismo sistema enzimático y familia de genes en el metabolismo de una amplia gama de xenobióticos que los animales, introduciendo el término "hígado verde" como una conceptualización de este paralelismo (Sandermann, 1994).

En forma general, la biotransformación de un compuesto químico puede dividirse en tres etapas, según el tipo de reacciones que se producen. En la fase I ocurren reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis de los compuestos químicos que desenmascaran o adicionan un grupo funcional reactivo a su molécula. En esta fase interviene para la mayoría de los xenobióticos el Sistema Oxidasa de Función Mixta cuyos componentes centrales son las citocromo P450 (CYP450). Intracelularmente, estas enzimas se encuentran principalmente en el retículo endoplasmático, e incluyen a un gran número de isoenzimas con variada afinidad por el sustrato. En peces, la isoenzima responsable de la biotransformación de un gran número de xenobióticos es la citocromo P4501A (CYP1A), incluyendo los genes CYP1A1 y CYP1A2 (van

der Oost et al., 2003). La medición de la deetilación de la etoxiresorufina a un producto fluorescente, la resorufina, catalizada por CYP1A (a través de la actividad de la etoxiresorufina-O-deetilasa; EROD) es sin duda el biomarcador más difundido en la comunidad científica y su determinación se ha estandarizado en algunos países. A su vez, la inducción o inhibición en los niveles y actividades de las enzimas de biotransformación de fase I se encuentran entre los biomarcadores más sensibles conocidos.

Por otra parte, en la Fase II de detoxificación se producen reacciones de conjugación, mediante la adición de moléculas endógenas al compuesto químico contaminante, o a los metabolitos del compuesto provenientes de la Fase I. Los compuestos polares con los que puede combinarse son: glutatión, ácido glucurónico en animales y glucosa en plantas, glicina, cisteína, sulfatos, entre otros. Las enzimas involucradas en esta etapa son, por ejemplo, Glutatión S-transferasa (GST) y Uridina Difosfato Glucuronosil Transferasa (UDPGT). En comparación con los sistemas de fase I, la inducción de las enzimas de fase II es generalmente menos pronunciada y puede estar enmascarada por factores de variabilidad natural (como sexo, madurez, nutrición, temporada, temperatura, etc.). La respuesta de estos biomarcadores puede ser causada por una gran variedad de compuestos químicos, siendo el sistema capaz de detectar exposiciones a distintos grados de contaminación como se observó para *Hyallela curvispina* recolectada en sitios de baja y alta contaminación con hidrocarburos (Del Brío et al., 2019). Sin embargo, sólo tienen un valor limitado para identificar los agentes causales de la respuesta.

Finalmente, tiene lugar la Fase III de procesamiento y excreción tanto en plantas como en animales. Esta etapa incluye la eliminación de los productos de reacciones de fase I y II como se ha descrito por ejemplo en plantas para conjugados del herbicida atrazina con el tripéptido glutatión (GSH). Consiste en la remoción de los aminoácidos glicina y ácido glutámico del conjugado GSH-atrazina importante en plantas y que no tiene equivalente en animales. Un ejemplo de biomarcador de esta fase metabólica en animales es la P-glicoproteína, capaz de expulsar compuestos endógenos o exógenos hacia el exterior celular como se discute en la siguiente sección.

Proteínas de estrés, metalotioneínas y resistencia a multixenobióticos

Algunos contaminantes ambientales, así como una amplia variedad de condiciones físicas, pueden inducir la síntesis de ciertas proteínas. Las más conocidas son las metalotioneínas (MTs), las proteínas de estrés, también llamadas “Heat Shock Proteins” (HSP) y las proteínas transmembrana de resistencia a multixenobióticos (MXR).

Las MTs son una familia de proteínas de bajo peso molecular (~7000 Da) con un contenido de cisteína (con grupos tioles: -SH) del 25% al 30% del total de aminoácidos que las componen y con la capacidad de unir de seis a siete átomos de metal por molécula. La función más importante de las MTs está relacionada con la regulación homeostática de metales. Pero además, participan de la detoxificación de metales esenciales y no esenciales cuando se encuentran en concentraciones mayores a las requeridas a nivel celular. Estas proteínas han sido identificadas en bacterias, hongos, invertebrados, vertebrados y también en plantas superiores. Numerosos

trabajos describen la utilización de MTs como biomarcadores de la exposición a metales en distintas especies acuáticas, así como su utilización en programas de biomonitoreo. Otro grupo de proteínas con alta afinidad por metales, las fitoquelatinas, se identificaron en plantas y algas y se utilizan como biomarcadores de la presencia de metales (Newman, 2015). Por otra parte, algunos estudios demuestran la capacidad antioxidante de las MTs en vertebrados e invertebrados acuáticos, aunque esta función se encuentra menos estudiada que la anterior. En el camarón de agua dulce *Palaemonetes argentinus* se demostró la inducción de MTs luego de la exposición a Zn (Bertrand et al., 2015), pero también una disminución de MTs cuando el organismo se expuso al insecticida clorpirifós. Esta disminución podría ser un posible mecanismo alternativo activado en el camarón para prevenir daños oxidativos (Bertrand et al., 2016). En un biomonitoreo activo realizado con el mismo organismo los niveles de MTs variaron entre los distintos sitios estudiados, sin embargo no se observó una correlación significativa con las concentraciones de metales medidas en agua o en sedimentos. Los niveles de MTs correlacionaron con los niveles intracelulares solubles de metales en el organismo, cumpliendo su función biológica aún en escenarios complejos de exposición (Bertrand et al., 2018).

Las proteínas de estrés son un grupo de proteínas inducibles involucradas en la protección y reparación de la célula en respuesta a condiciones perjudiciales incluyendo temperaturas bajas y altas, luz UV, condiciones oxidativas, anoxia, estrés salino, metales pesados y xenobióticos (Newman, 2015). Se identificaron por primera vez en organismos expuestos a cambios abruptos de temperatura (5 a 15°C), de allí que se conocieran como “Heat Shock Proteins”. Su nombre está dado por el peso molecular, por lo que las más conocidas son hsp90, hsp70 y hsp60 (con 90, 70 y 60 kDa, respectivamente). Las de 16 a 24 kDa se conocen como LMW (bajo peso molecular) y la de 7 kDa como Ubiquitina. En un estudio realizado en el bivalvo de la Patagonia Norte *Diplodon chilensis* se observó una inducción de expresión de hsp90 en condiciones de anoxia (<0,2mg O₂/L), mientras que no se encontraron cambios en la expresión de hsp70 en anoxia, hipoxia o normoxia (Yusseppone et al., 2018). Debido a que diferentes condiciones de estrés pueden inducir diversas proteínas de estrés y en diferente grado, se sugiere el uso de patrones de inducción de proteínas de estrés (huellas dactilares de proteínas de estrés) comparando situaciones control y de exposición (Newman, 2015).

Finalmente, el Sistema de Resistencia a Multixenobióticos (MXR) ha sido identificado en numerosos organismos acuáticos y se propone como posible biomarcador de contaminación. La proteína efectora de esta función es una P-glicoproteína (Pgp) que está involucrada en la eliminación desde el interior celular de variados compuestos tóxicos endógenos y exógenos (moderadamente hidrofóbicos, de bajo peso molecular y planos). Estas proteínas, y otras proteínas de membrana son parte de la familia de transportadores ABC (transportadores dependientes de ATP. Estas proteínas se expresan en tejidos epiteliales especializados, implicados en la secreción y la excreción, tales como el intestino, el hígado y el riñón. La inducción del sistema MXR en *J. multidentata* se detectó luego de la exposición a una cianotoxina (Amé et al., 2009) y a clorpirifós (Bonansea et al., 2016). Ensayos de campo mostraron

que existe una relación entre mayores niveles de expresión y mayor nivel de contaminación ambiental (Roméo & Giambérini, 2013).

Estrés oxidativo

Dentro de los biomarcadores bioquímicos más utilizados hoy día, por ser muy sensibles tanto en animales como en plantas, se encuentran los parámetros indicadores de estrés oxidativo (enzimas antioxidantes principalmente y productos de peroxidación lipídica, como el malondialdehído [MDA]).

El estrés oxidativo (para más detalles ver Capítulo 5) es un efecto demostrado para gran cantidad de contaminantes de diferente naturaleza (ej.: metales, hidrocarburos poliaromáticos, xenobióticos orgánicos tales como plaguicidas). Se define como un desbalance entre la generación y neutralización, mediada por mecanismos antioxidantes, de especies reactivas del oxígeno (ROS) (también llamados radicales libres) en un organismo. La producción de ROS puede ser incrementada por diferentes vías tales como la inducción de citocromos P450, el desacople de los sistemas de transporte de electrones mitocondrial, y en plantas de la cadena de transporte de electrones fotosintética.

En la [Figura 13.1](#) pueden observarse las ROS, las defensas celulares capaces de neutralizar el exceso de ROS y sus consecuencias toxicológicas cuando los sistemas de defensa no logran ser eficientes.

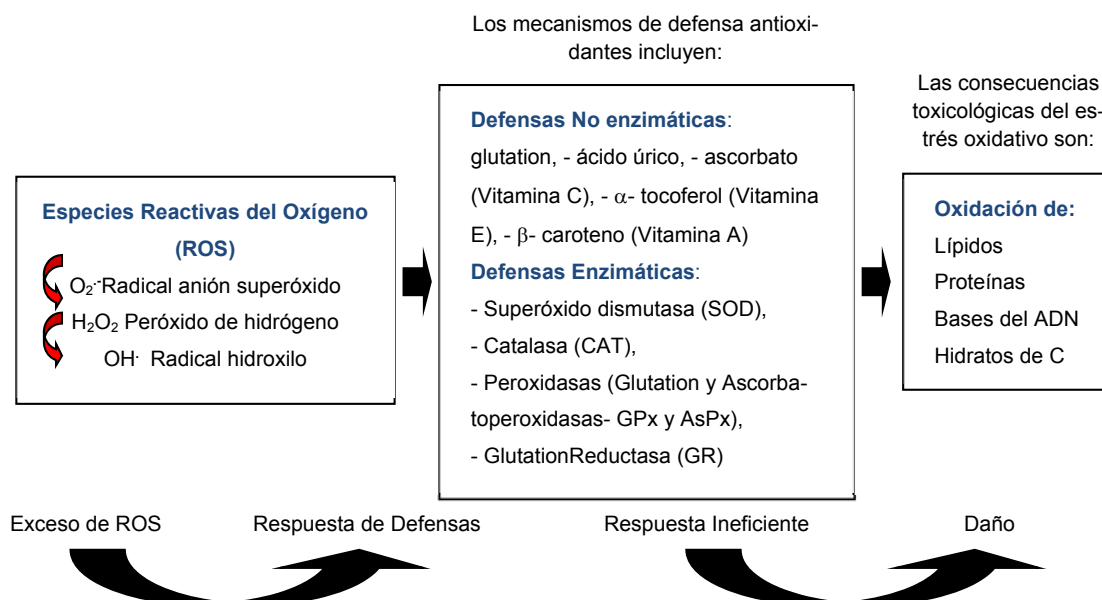


Figura 13.1: Diagrama del efecto de estrés oxidativo: especies reactivas del oxígeno, defensas celulares y sus consecuencias.

En los peces se ha descrito el efecto de estrés oxidativo, por ejemplo, causado por el insecticida endosulfán, tanto en cultivos de células adrenocorticales de *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco iris) como *in vivo* en *Channa punctatus* y en especies nativas de Argentina. En términos generales se observó un patrón de inhibición de enzimas antioxidantes con el aumento concomitante del contenido de MDA en diferentes órganos de las especies ictícolas *J. multidentata*, *Prochilodus lineatus* (sábalo) y *Australoheros facetus* (chanchita) (Ballesteros et al., 2009a; Bachetta et al., 2011; Crupkin et al., 2013). Este insecticida también es capaz de generar el mismo efecto en plantas, como lo evidencia la exposición de la macrófita acuática *Myriophyllum quitense* (gambarrusa) en la que se observó el incremento de las actividades enzimáticas de CAT, GST y GR y del contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), una de las ROS (Menone et al., 2008). En la misma especie este efecto se ha demostrado por exposición a azoxystrobina, un fungicida estrobilurínico muy utilizado hoy día en Argentina, cuyo mecanismo de acción involucra el desacople del sistema de transporte de electrones mitocondrial en hongos, pero que también es capaz de generar daño oxidativo evidenciado por la inhibición de las enzimas CAT y guaiacol peroxidasa (POD) y el incremento concomitante en los niveles de MDA (Garanzini et al., 2015; 2019). Así, concentraciones de relevancia ambiental en exposiciones agudas, que reflejarían pulsos de agroquímicos posibles de detectarse en el ambiente luego de eventos de escorrentía desde campos de cultivo, fueron capaces de originar estrés oxidativo en especies nativas que habitan ecosistemas dulceacuícolas de Argentina y los parámetros seleccionados constituyeron biomarcadores de dicho efecto.

Estos biomarcadores son los más utilizados, principalmente debido a su sensibilidad alta así como por la variedad de contaminantes capaces de generar el efecto de estrés oxidativo. En el Anexo I se detalla la técnica para la medición de la actividad de la enzima catalasa.

Parámetros neuromusculares

Para el normal funcionamiento de los sistemas sensoriales y neuromusculares, en casi todos los taxa del reino animal, el neurotransmisor acetilcolina es vital, dado que es utilizado para transmitir impulsos nerviosos a través de la sinapsis. La enzima acetilcolinesterasa (AChE) tiene una función clave en la regulación o desactivación de esta transmisión nerviosa mediante la hidrólisis de la acetilcolina. Es por ello que cualquier sustancia que inhibe su actividad catalítica determinará que la acetilcolina se acumule en las terminaciones nerviosas y permanezca por más tiempo estimulando sus receptores postsinápticos, lo cual puede provocar temblores, disfunción motora y la muerte del animal. Los peces, por ejemplo, mueren cuando la actividad de AChE disminuye más del 70-80%.

Los plaguicidas organofosforados (OPs) y carbamatos inhiben la actividad de AChE. Dicha inhibición ha sido, por lo tanto, utilizada para evaluar la naturaleza y extensión de la exposición de la vida silvestre a este tipo de compuestos. La medición de AChE es más sencilla, rápida y menos costosa que los análisis químicos de OPs y carbamatos, los cuales son metabolizados y eliminados rápidamente. Por el contrario, la inhibición de AChE puede persistir más tiempo, lo cual serviría para demostrar la exposición previa de los organismos a estos compuestos. Por

ejemplo, en monitoreos en el río Reconquista se observó inhibición de AChE en el cerebro del pez *Cnesterodon decemmaculatus* recolectados en sitios donde no se encontró en agua cantidades detectables de insecticidas OPs (de la Torre et al., 2005).

A pesar de la utilidad como un biomarcador específico, en los últimos años, se ha generado evidencia de que otros tóxicos (ej., otros plaguicidas, detergentes, metales, toxinas de cianobacterias) exhiben actividad anticolinesterásica.

Otros posibles biomarcadores neuromusculares son las alteraciones que pueden generar determinados tóxicos sobre la estructura de las miofibrillas del músculo esquelético y su capacidad de contracción. Así, por ejemplo, se han detectado proteínas miofibrilares muy susceptibles al estrés oxidativo como indicadores de toxicidad del insecticida endosulfán (Crupkin et al., 2018).

Genotoxicidad

Si bien en el presente libro hay un capítulo particularmente sobre estos efectos (ver Capítulo 7), aquí mencionaremos los más utilizados en bioindicadores vegetales, particularmente en macrofitas acuáticas. En 1984 el “International Program on Chemical Safety (IPCS)”, auspiciado por el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), inició un estudio colaborativo para evaluar el uso de bioensayos de corto plazo con plantas para la detección de sustancias potencialmente mutagénicas y carcinogénicas. Entre los modelos de bioensayos utilizados se encuentra el ensayo de pelos estaminales en *Tradescantia palludosa* para detectar mutaciones génicas, el ensayo de aberraciones cromosómicas en ápices de raíz en *Vicia faba* y el de micronúcleos (MN) en *T. palludosa*. Hoy día, estos ensayos están estandarizados, siendo el principal a nivel citogenético el test de aberraciones cromosómicas en células mitóticas, usualmente cuantificadas en ápices radicales, tanto en especies terrestres modelo (ej.: *Allium cepa*, *V. faba*) como en especies alternativas como la palustre *Bidens laevis*. El test de Aberraciones Cromosómicas en Anafase-Telofase (ACAT), se aplica para la evaluación de aguas provenientes de fuentes naturales (ríos, lagos, lagunas), de efluentes industriales y domésticos y de químicos solubles e insolubles en agua (Mudry y Carballo, 2006). Como ejemplo podemos mencionar su uso para definir genotoxicidad de plaguicidas de uso actual en bioensayos de laboratorio utilizando la especie palustre *B. laevis* (Pérez et al., 2014, Moreyra et al., 2019). Este biomarcador es metodológicamente simple, confiable y de bajo costo. A nivel molecular, y no tan común como en animales, se estudia la fragmentación del ADN nuclear mediante el ensayo “cometa”. Esta técnica está basada en la visualización del daño en el ADN en células individuales, y comenzó a utilizarse en los 1990’s en *V. faba* (Koppen y Verschaeve 1996).

Perturbación endócrina

La OMS define a los perturbadores endócrinos (para más detalle ver Capítulo 8) como sustancias exógenas que alteran la función del sistema endocrino y consecuentemente causan efectos adversos sobre la salud de un organismo, de su progenie, o de sus poblaciones (OMS/PISQ, 2002). Los perturbadores endócrinos actúan imitando o antagonizando las hormonas endógenas, alterando el patrón normal de síntesis, almacenamiento, liberación, transporte, metabolismo,

unión, acción y eliminación de las hormonas o modificando los niveles de sus receptores. La medición de cualquier disfunción endócrina podría ser utilizada como biomarcador. Sin embargo, sólo algunas pocas respuestas han sido lo suficientemente estudiadas para ser aplicadas en estudios ecotoxicológicos. Una de ellas es la expresión de vitelogenina (proteína precursora de la yema del huevo) cuyo uso como biomarcador de perturbación endócrina está aceptado en vertebrados, pero aún es discutido en invertebrados (Amiard & Amiard-Triquet, 2015). En condiciones naturales, sólo las hembras maduras producen esta proteína. La inducción de vitelogénesis en machos o la variación en sus niveles de expresión son evidencia directa de exposición a sustancias con actividad estrogénica, como ha sido observado en machos de *Gambusia affinis* aguas abajo de una planta depuradora de líquidos cloacales (Rautenberg et al., 2015).

Hematología

Los biomarcadores hematológicos son importantes para el diagnóstico del estado de salud general de los vertebrados. Dentro de los parámetros sanguíneos se incluyen el conteo de glóbulos rojos, contenido de hemoglobina, hematocrito, índices hematimétricos derivados (volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media), cantidad de glóbulos blancos, frecuencia leucocitaria, etc. El uso de estos biomarcadores resulta barato y rápido, y una alteración en sus valores puede indicar etapas tempranas de enfermedad. Sin embargo, no son específicos y requieren el conocimiento previo de sus valores de referencia, dado que pueden verse alterados por una variedad de factores intrínsecos y extrínsecos (ej, sexo, estadio reproductivo, estado nutricional, edad, estacionalidad, calidad ambiental).

Este tipo de biomarcadores responden al estrés ambiental y exposición a diferentes xenobióticos. Se han empleado, por ejemplo, para monitorear las respuestas de los peces a metales, plaguicidas, sitios contaminados y, por lo tanto, su estado de salud en tales condiciones adversas (ej., Cazenave et al., 2005, Da Cuña et al., 2011).

Histopatología

La histología es una herramienta útil para evaluar particularmente los efectos subletales y crónicos de la contaminación. Las alteraciones histológicas son el resultado de cambios bioquímicos y fisiológicos en un organismo y sirven para predecir posibles efectos sobre otros procesos o niveles de organización biológica (crecimiento, reproducción, comportamiento, población) (Hinton & Laurén, 1990). El uso de estos biomarcadores permite el examen de diferentes órganos o tejidos, e incluso de animales enteros (ej., huevos, larvas, adultos de especies pequeñas). Otra ventaja que poseen estos biomarcadores es que son relativamente fáciles de medir, utilizándose métodos convencionales (fijación, procesamiento, tinción) que no son costosos. Además, el avance tecnológico permite análisis cuantitativos de las patologías observadas (morfometría, medición de áreas afectadas, etc.), lo cual favorece el desarrollo de métodos estandarizados para la descripción y evaluación de los cambios observados.

La capacidad para identificar alteraciones dependerá no solo de la correcta preparación de los cortes histológicos sino también de la experiencia del investigador para detectar y clasificar las patologías. Algo a tener en cuenta es que, al igual que otros biomarcadores, varios factores pueden generar cambios histopatológicos (ej., hormonas, estado nutricional, ciclos estacionales). Otra desventaja del uso de estos biomarcadores es que raramente un compuesto tóxico pueda estar asociado a un solo tipo de lesión. A pesar de ello, son frecuentemente utilizados, tanto en estudios de campo como de laboratorio, dado que brindan una visión a un nivel de integración mayor que los marcadores bioquímicos o fisiológicos.

Entre los organismos acuáticos, los peces representan uno de los grupos más estudiados a nivel histológico. Si bien varios órganos pueden ser evaluados, el hígado y las branquias resultan estratégicos desde el punto de vista toxicológico. Las branquias constituyen un tejido particularmente susceptible a contaminantes ambientales debido a que se encuentran en contacto directo con el medio, por lo que representan la primera barrera para el ingreso de tóxicos. A partir de la identificación de diversas patologías en este órgano, es posible inferir la afección de una o más de sus múltiples funciones (respiración, regulación iónica, excreción de desechos nitrogenados).

Por otra parte, el hígado juega un rol clave en el metabolismo energético y respuesta de defensa a compuestos tóxicos exógenos. Su análisis histológico puede evidenciar desbalances metabólicos debido a un mayor depósito de glucógeno o lípidos (ej., a través de la observación de vacuolas en sus hepatocitos), alteraciones estructurales o patologías producto de exposiciones crónicas, entre otras.

Biomarcadores fisiológicos o de condición

Al evaluar el impacto de los contaminantes sobre las plantas y animales, no debe pasar por alto un examen de su morfología, aspecto y otras características generales sobre su condición. A partir de algunas medidas somáticas pueden calcularse de manera sencilla, barata y rápida varios índices. Tales mediciones sirven para identificar a los ejemplares más sensibles de una población, proporcionar información sobre las reservas de energía y posiblemente la capacidad de los animales para tolerar los contaminantes.

Dentro de este grupo de biomarcadores pueden mencionarse el factor de condición (relación entre el peso corporal y la longitud) que sirve para evaluar el estado general de los peces, y el índice hepatosomático (relación entre el peso del hígado y el peso total del organismo) para identificar posibles enfermedades del hígado. Si bien se ha demostrado que estos índices responden a la exposición a una amplia variedad de compuestos tóxicos, también presentan fluctuaciones estacionales y fisiológicas asociadas a cambios en la alimentación, disponibilidad de nutrientes, desarrollo y maduración sexual, etc.

En plantas, los biomarcadores fisiológicos más utilizados son los pigmentos fotosintéticos, clorofilas “a” y “b” y carotenoides. Algunos xenobióticos pueden afectar la síntesis de estos pigmentos directamente y otros indirectamente como los herbicidas que interrumpen la síntesis de membranas. Estos parámetros resultan más sensibles que otros indicadores de estrés como la biomasa o la tasa relativa de crecimiento, si bien los efectos de algunos contaminantes químicos

sobre estos pigmentos pueden ser influenciados por condiciones de crecimiento ambientales. El contenido y/o composición de pigmentos se usa generalmente también en microalgas, donde el contenido de pigmento equivale a la biomasa de algas vivas. En todos los casos, son biomarcadores fácilmente medibles y aplicables a estudios de laboratorio y de campo.

Comportamiento

El comportamiento consiste en una serie de actividades explícitas observables del cuerpo entero, el cual opera a través del sistema nervioso y asiste a los animales para sobrevivir, crecer y reproducirse (Beitinger, 1990). Desde una perspectiva ecotoxicológica, la observación de cambios en el comportamiento permite evaluar los efectos subletales de químicos, identificar modos de acción tóxica, y proveer un nexo entre procesos celulares y las consecuencias ecológicas de la contaminación ambiental (para más detalle ver Capítulo 9).

Los biomarcadores comportamentales se usan con éxito en organismos acuáticos, particularmente en peces y microcrustáceos. Varios estudios evaluaron los efectos de pesticidas sobre el comportamiento de peces nativos (Ballesteros et al., 2009b, Bonifacio et al., 2017), incluso demostrándose la correlación entre la inhibición de AChE y una disminución de la actividad natatoria en la especie *J. multidentata* expuesta al insecticida clorpirifós (Bonansea et al., 2016).

Por otro lado, los estudios de comportamiento pueden brindar información con un mayor realismo ecológico, como por ejemplo cuando se estudian los efectos de contaminantes sobre la relación predador-presa. Un ejemplo de ello es el estudio de Gutiérrez & Negro (2014) quienes observaron que el clorpirifós causó una alteración en la interacción trófica entre el camarón *Macrobrachium borellii* y el cladócono *Ceriodaphnia dubia*.

A pesar de su utilidad, estos biomarcadores no son incluidos rutinariamente en evaluaciones de riesgo o establecimiento de criterios de calidad del agua. Los principales problemas que han limitado la aceptación del comportamiento como herramienta regulatoria son la dificultad para asociar cambios comportamentales con un químico específico y la carencia de ensayos estandarizados y verificación en campo (Newman & Unger, 2011).

Por el contrario, existen protocolos estandarizados para evaluar algunos comportamientos de ciertos organismos terrestres, tales como el test de evasión de lombrices de tierra (ISO, 2005) o aves (OECD, 2011). Estos ensayos han sido usados por algunos grupos de trabajo en nuestro país (Addy Orduna et al., 2013, Salvio et al., 2016).

Consideraciones finales

La utilización de biomarcadores claramente permite obtener información que no puede ser obtenida desde la medición de residuos químicos en las distintas matrices ambientales (agua, sedimento, suelo, biota). Es importante tener en cuenta que un enfoque que hace uso de parámetros biológicos no reemplaza las estrategias de monitoreo químico, sino que los complementa, brindando información sobre los efectos de los contaminantes de forma integradora dado que

reflejan que el contaminante está presente, ha sido incorporado por los organismos y/o ha generado un efecto tóxico.

Si bien los biomarcadores resultan particularmente útiles cuando sus respuestas pueden relacionarse directamente a una clase de compuesto químico, la medición de un conjunto de biomarcadores inespecíficos y a diferentes niveles de organización biológica, permite una evaluación integral del estado de salud o condición de los organismos expuestos. Particularmente, en las evaluaciones de calidad del agua, donde en general existen escenarios complejos de exposición (ej., mezclas de compuestos químicos y otros factores de estrés), se recomienda el uso de una **batería de biomarcadores** complementarios para comprender cómo responde un organismo a la carga total de contaminación en un área. Este enfoque multibiomarcador viene siendo usado desde hace un tiempo y, junto con herramientas de análisis estadístico apropiadas, permite obtener una mirada global del potencial impacto de los contaminantes sobre la salud de los organismos bajo estudio. Así, el uso de baterías de biomarcadores es fundamental en estudios actuales de contaminación ambiental y ecotoxicología.

Aunque los biomarcadores se presentan como herramientas valiosas para el monitoreo ambiental, está claro que se necesita más información sobre los niveles basales y la variabilidad natural de estas respuestas en especies nativas. En Argentina las investigaciones en este campo se han incrementado en los últimos años, hecho que ha permitido observar la sensibilidad generalmente mayor de las especies nativas en relación a las especies modelo del hemisferio norte. Por otra parte, se necesitan llevar a cabo más estudios que validen en campo los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio. La variabilidad debida a otros factores (ambientales tales como la temperatura o inherentes a los individuos tales como el sexo o la talla) debe ser comprendida y debe estar dentro de límites aceptables para evitar falsos negativos o falsos positivos.

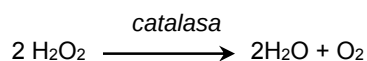
Si bien queda mucho trabajo por delante para evaluar e interpretar las respuestas de los biomarcadores y desarrollar procedimientos de control de calidad aceptables, los esfuerzos para incorporarlos en programas de monitoreo de rutina seguramente serán beneficiosos.

ANEXO I: Técnica Catalasa- Biomarcador del efecto de estrés oxidativo en animales y plantas

CATALASA (Beutler, 1982)

Fundamento:

El peróxido de hidrógeno es una especie reactiva de oxígeno que se genera producto del metabolismo aerobio y que es dañina para la célula dado que puede reaccionar con diferentes biomoléculas oxidándolas. Por ello, en la evolución biológica se han originado enzimas como la catalasa que específicamente cataliza la descomposición de H_2O_2 de acuerdo con la siguiente reacción:



Esta enzima es particularmente abundante en los peroxisomas de los hepatocitos y su alta procesividad y fácil determinación la hace un biomarcador comúnmente en ecotoxicología para evaluar el estatus del sistema antioxidante.

Procedimiento:

Homogenización del tejido: La muestra de hígado o tejido a evaluar suele homogenizarse en solución tampón (fosfato o Tris-HCl) a pH 7,2 utilizando un mortero u homogeneizador de vidrio (tipo Potter- Elvehjem), rotor-estator (tipo Politrón o Ultra-Turrax) o de ultrasonido. En tejidos animales la relación tejido:solución tampón suele ser de 1:4. El procedimiento debe realizarse siempre manteniendo el frío en baño de hielo para evitar procesos degradativos. Para una mayor purificación de la enzima, el homogenato debe filtrarse a través de una gaza estéril y luego centrifugarse en una centrífuga de mesada refrigerada a la mayor potencia disponible (ej. 10.000 g por 20 min a 4 °C). La actividad de la catalasa será evaluada en el sobrenadante resultante. Por lo general requiere de una dilución posterior del homogenato (ej. 1:100) en la misma solución tampón para evitar la formación de burbujas de O₂ en la cubeta dada la alta procesividad de la enzima.

Determinación de la actividad enzimática:

	Blanco (μL)	Muestra (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8.0	50	50
H ₂ O ₂ (12 μM)	-	900
H ₂ O	930	30
Incubar a 37°C por 10 min		
Muestra (extracto enzimático)	20	20

Comentarios y cálculos:

La velocidad de descomposición de H₂O₂ por catalasa se puede seguir por la disminución de la absorbancia medida espectrofotométricamente a 240 nm.

La reacción es lineal sólo durante los primeros 3 o 4 minutos. Por lo tanto, el registro de la densidad óptica debe comenzar inmediatamente después de la adición del extracto.

La actividad enzimática específica se calcula usando un coeficiente de extinción molar de $\epsilon = 43.6 \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$ y se expresa como cantidad de enzima que degrada 1μM de H₂O₂/min/mg proteína. Para este cálculo debe determinarse la cantidad de proteínas totales en el homogenato que puede ser realizado por el método de Lowry (1951) o Bradford (1976). Alternativamente el valor de la actividad podría ser normalizado por la masa de tejido, pero el error de la estimación será mayor debido a posibles diferencias en la eficiencia de la homogeneización.

Bibliografía

- Addy Orduna, L., Wouterlood, N., Canavelli, S. (2013). Evaluación de un tratamiento de semillas para repeler palomas medianas (*Zenaida auriculata*) del cultivo de soja en emergencia. *INTA EEA Paraná. Serie Extensión*, 69, 45-50.
- Amé, M.V., Baroni, M.V., Galanti, L.N., Bocco, J.L., Wunderlin, D.A. (2009). Effects of Microcystin-LR on the Expression of P-glycoprotein in *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere*, 74, 1179–1186.
- Amiard, J-C, Amiard-Triquet, C. (2015). Ecotoxicological Risk of Endocrine Disruptors. In Amiard-Triquet, Amiard, Mouneyrac (Ed.), *Aquatic Ecotoxicology* (pp. 355-382). San Diego: Academic Press.
- Bachetta, C., Cazenave, J., Parma, M.J. 2011. Responses of biochemical markers in the fish *Prochilodus lineatus* exposed to a commercial formulation of endosulfan. *Water Air Soil Pollution*, 216, 39-49.
- Ballesteros, M.L., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A. (2009a). Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 199-205.
- Ballesteros, M.L., Durando, P.E., Nores, M.L., Díaz, M.P., Bistoni, M.A., Wunderlin, D.A. (2009b). Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environmental Pollution*, 157, 1573–1580.
- Beitinger, T.L., 1990. Behavioural reactions for the assessment of stress in fishes. *Journal of Great Lakes Research*, 16, 495–528.
- Bertrand, L., Monferrán, M.V., Métais, I., Mouneyrac, C., Amé, M.V. (2015). Subcellular distribution of zinc and associated Metallothioneins induction in a freshwater decapod crustacean of South America, *Palaemonetes argentinus*. *Ecological Indicators*, 48, 533-541.
- Bertrand, L., Monferrán, M.V., Mouneyrac, C., Bonansea, R.I., Asis, R., Amé, M.V. (2016). Sensitive biomarker responses of the shrimp *Palaemonetes argentinus* exposed to chlorpyrifos at environmental concentrations: Roles of alpha-tocopherol and metallothioneins. *Aquatic Toxicology*, 179, 72-81.
- Bertrand, L., Monferrán, M.V., Mouneyrac, C., Amé, M.V. (2018). Native crustacean species as a bioindicator of freshwater ecosystem pollution: a multivariate and integrative study of multi-biomarker response in active river monitoring. *Chemosphere*, 206, 265-277.
- Beutler, E. (1982). *Catalase*. In E. Beutler (Ed.), *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods* (pp. 105–106). New York: Grune and Stratton Inc.
- 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.

- Bonifacio, A.F., Ballesteros, M.L., Bonansea, R.I., Filippi, I., Amé, M.V., Hued, A.C. (2017). Environmental relevant concentrations of a chlorpyrifos commercial formulation affect two neotropical fish species, *Cheirodon interruptus* and *Cnesterodon decemmaculatus*. *Chemosphere*, 188, 486-493.
- Cazenave, J., Wunderlin, D.A., Hued, A.C., Bistoni, M.Á. (2005). Haematological parameters in a Neotropical fish, *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Callichthyidae) captured from pristine and polluted water. *Hydrobiologia*, 537, 25–33.
- Crupkin, A.C., Carriquiriborde, P., Mendieta, J., Panzeri, AM, Ballesteros, ML, Miglioranza KSB, Menone, M.L. (2013). Oxidative stress and genotoxicity in the South American Cichlid, *Australoheros facetus*, after short-term sublethal exposure to endosulfan. *Pesticide Physiology and Biochemistry*, 105, 102- 110.
- Crupkin, A.C., Iturburu, F.G., Crupkin, M., Menone, M.L. (2018). Myofibrillar functional desregulation in fish: a new biomarker of damage to pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38: 44- 49.
- Da Cuña, R.H., Rey Vázquez, G., Piol, M.N., Verrengia Guerrero, N., Maggese, C., Lo Nostro, F.L. (2011). Assessment of the acute toxicity of the organochlorine pesticide endosulfan in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 1065–1073.
- de la Torre, F.R., Ferrari, L., Salibián, A. (2005). Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere*, 59, 577–583.
- Del Brio, J., Lares, B.A., Parra-Morales, L.B., Sanchez, V.G., Montagna, C.M., Venturino, A. (2019). Differential detoxifying responses to crude oil water-accommodated fraction in *Hyallocheilichthys curvispina* individuals from unpolluted and contaminated sites. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 70, 103-191.
- Garanzini, D., Medici, S., Moreyra, L, Menone, M.L. (2019). Acute exposure to a commercial formulation of Azoxystrobin alters antioxidant enzymes and elicit damage in the aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25, 135- 143.
- Garanzini, D.S., Menone, M.L. (2015). Azoxystrobin causes oxidative stress and DNA damage in the aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94, 146-151.
- Gutiérrez, M.F., Negro, C.L. (2014). Predator-prey imbalances due to a pesticide: density and applicability timing as determining factors for experimental assessments. *Ecotoxicology*, 23, 1210-1219.
- Hinton, D.E., Laurén, D.J. (1990). Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In: ADAMS S.M. (Ed) *Biological Indicators of Stress in Fish*. Bethesda, Maryland: *American Fisheries Society Symposium*, 51-66.
- Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M. Jr., Bergman, H.L. (1992). *Biomarkers. Biochemical and Physiological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers. Chelsea, USA. 347 pp.

- ISO (2005). Draft: soil quality—avoidance test for evaluating the quality of soils and the toxicity of chemicals. Test with Earthworms (*Eisenia fetida/andrei*). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Koppen, G., Verschaeve, L. (1996). The alkaline comet on plant cells: A new genotoxicity test for DNA breaks in *Vicia faba* roots cells. *Mutation Research*, 360, 193-200.
- Menone, M.L., Pesce, S.F., Díaz, M.P., Moreno, V.J., Wunderlin, D.A. (2008). Endosulfan Induces Oxidative Stress and Changes On Detoxication Enzymes in the Aquatic Macrophyte *Myriophyllum quitense*. *Phytochemistry*, 69, 1150-1157.
- Moreyra, L.D., Garanzini, D.S., Medici, S., Menone, M.L. (2019). Evaluation of growth, photosynthetic pigments and genotoxicity in the wetland macrophyte *Bidens laevis* exposed to tebuconazole. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 102, 353-357.
- Mudry, M.D., Carballo, M.A. (2006). Genética Toxicológica. Ed. De los cuatro vientos. Buenos Aires. p 320-322.
- Newman, M.C., Unger, M.A. (2011). *Fundamentals of Ecotoxicology*. Second Edition. Boca Raton CRC Press. 458 pp.
- Newman, M.C., (2015). *Fundamentals of Ecotoxicology*. Fourth Edition. Boca Raton CRC Press. 664 pp.
- OECD (2011). Draft guidance document on avoidance testing of birds. Draft GD 27th January 2011.
- Ondarza, P.M., Haddad, S.P., Avigliano, E., Miglioranza, K.S.B., Brooks, B.W. (2019). Pharmaceuticals, illicit drugs and their metabolites in fish from Argentina: Implications for protected areas influenced by urbanization. *Science of The Total Environment*, 649, 1029-1037.
- Organización Mundial de la Salud, Programa Internacional sobre Seguridad Química (OMS/PISQ). (2002). Global Assessment Of The State-Of-The-Science Of Endocrine Disruptors. WHO/PCS/EDC/02.2.180 pp.
- Peakall, D.W. (1994). Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicology and Ecotoxicology News* 1, 55-60.
- Pérez, D. J., Lukaszewicz, G., Menone, M.L., Amé, M.V., Camadro, E.L. (2014). Genetic and biochemical biomarkers in the macrophyte *Bidens laevis* L. exposed to a commercial formulation of endosulfan. *Environmental Toxicology* 29, 1063- 1071.
- Rautenberg, G.E., Amé, M.V., Monferrán, M.V., Bonansea, R.I., Hued, A.C. (2015). A multi-level approach using *G. affinis* as a bioindicator of environmental pollution in the middle-lower basin of Suquia River. *Ecological Indicators*, 48, 706-720.
- Roméu, M., Giambérini, L. (2013). History of Biomarkers. In Amiard-Triquet, Amiard, Rainbow (Ed.), *Ecological Biomarkers* (pp. 15-44). Boca Raton: CRC Press.
- Salvio, C., Menone, M.L., Rafael, S., Iturburu, F.G., Manetti, P.L. (2016). Survival, reproduction, avoidance behavior and oxidative stress biomarkers in the Earthworm *Octolasion cyaneum* exposed to glyphosate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 96, 314-319.
- Sandermann, H. (1994). Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics* 4, 225-241.

- Valdés, M.E., Huerta, B. Wunderlin, D.A. Bistoni, M.A., Barceló, D., Rodríguez-Mozaz, S. (2016). Bioaccumulation and bioconcentration of carbamazepine and other pharmaceuticals in fish under field and controlled laboratory experiments. Evidences of carbamazepine metabolism by fish. *Science of the Total Environment*, 557–558, 58–67.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57–149.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B. (2001). Principles of Ecotoxicology. Second Edition. Taylor & Francis, London.
- WHO, International Programme on Chemical Safety (1993). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva.
- Yusseppone, M.S., Rocchetta, I., Sabatini, S.E., Luquet, C.M., Ríos de Molina, M.C., Held, C., Abele, D. (2018). Inducing the Alternative Oxidase Forms Part of the Molecular Strategy of Anoxic Survival in Freshwater Bivalves. *Frontiers in Physiology*, 9, 100.

CAPITULO 14

Evaluación de Riesgo Ecológica

Pablo M. Demetrio

La producción de bienes y servicios por parte del hombre pueden generar una variedad de estresores físicos, químicos y biológicos que producen o pueden producir impactos negativos sobre el ambiente y la integridad estructural y/o funcional de los ecosistemas. En consecuencia, resulta fundamental disponer de metodologías apropiadas que permitan identificar los principales peligros y efectos sobre los ecosistemas, evaluar los riesgos asociados y gestionar las medidas necesarias para su manejo.

La Ecotoxicología tiene dentro de sus objetivos, proporcionar conocimiento básico para la identificación y valoración de la peligrosidad de diferentes sustancias químicas. Esta información puede incorporarse en un esquema conocido como Evaluación de Riesgos, siendo una valiosa herramienta disponible para evaluar el riesgo de una sustancia sobre la salud humana y el medio ambiente; y ha sido adoptada de manera amplia en distintas legislaciones nacionales e internacionales.

Los tomadores de decisiones tienen el desafío de resolver problemas ambientales complejos asociados con las presiones crecientes generadas por las actividades humanas sobre los ecosistemas. Estos desafíos se hacen difíciles por la cantidad y diversidad de perturbaciones humanas y se amplifica más por la comprensión imperfecta de los sistemas ecológicos. El proceso de la Evaluación de Riesgos aborda la complejidad ecológica intentando incorporar la incertidumbre en la caracterización de los impactos provocados por el hombre sobre los ecosistemas.

La Evaluación del Riesgo Ecológico es el proceso por el que se define la probabilidad de un determinado estrés para producir efectos ecológicamente adversos; en la bibliografía se utiliza la sigla ERA (*Ecological Risk Assessment*) para hacer referencia a este proceso. En el presente capítulo focalizaremos la ERA para la evaluación de estresores químicos individuales, aunque hay que mencionar que el esquema utilizado se ha generalizado tanto para múltiples estresores como para estresores de otra naturaleza (no solo de origen químico).

Las ERAs se derivan de necesidades específicas para evaluar los impactos en el medio ambiente inducidos por el hombre. Además del contexto vinculado a la investigación académica, muchas ERAs realizadas son motivados por la legislación y llevadas adelante por organismo gubernamentales; como así también por la industria privada para determinar futuros riesgos y responsabilidades asociados con el desarrollo, uso y eliminación de productos nuevos o existentes (por ejemplo, plaguicidas y productos químicos industriales).

Orígenes de la ERA

La legislación ambiental establecida en los Estados Unidos durante la década del '70 y '80 requirió evaluaciones de los riesgos para la salud pública y el medio ambiente. Como consecuencia de esto se generó una metodología formalizada para la ERA. La ERA tiene sus raíces metodológicas fusionando herramientas de las evaluaciones de seguros tradicionales (seguros de vida, por ejemplo) con enfoques de la evaluación ecológica (Evaluación de Impacto Ambiental), siguiendo los lineamientos del enfoque de riesgos sobre salud humana que se encontraba con mayor grado de desarrollo en ese momento. En los '90 quedó completado el marco conceptual hoy conocido, diferenciándose las metodologías de la ERA y aquellas enfocadas sobre salud humana; e incorporando, además a las partes interesadas durante el proceso (*stakeholders*) y la figura del gestor de riesgo.

Debido a la inclusión o no de la salud humana dentro de la evaluación hay que diferenciar la *Evaluación de Riesgo Ambiental* de la *Evaluación de Riesgo Ecológica*; la diferencia entre ambas radica en el alcance de las unidades potencialmente afectadas. Por un lado, la Evaluación de Riesgo Ecológico sólo considera la evaluación de los potenciales efectos sobre las unidades ecológicas (lo que muchas veces se considera medio natural) sin incluir la población humana, mientras que la Evaluación de Riesgo Ambiental tiene como alcance la evaluación de riesgo de los potenciales efectos de los impactos ambientales sobre seres humanos y el medio natural. En el presente capítulo siempre estaremos en el marco de la Evaluación de Riesgo Ecológica, salvo que ese se especifique el caso contrario

Marco Conceptual

La estructura y terminología de la ERA se puede observar en la [Figura 14.1](#). Distintos países (Canadá, Australia, países europeos, entre otros) siguieron abordajes similares generando metodologías propias sin grandes diferencias estructurales en el marco conceptual. Para el presente capítulo seguiremos como base los lineamientos de la USEPA (United States Environmental Protection Agency); focalizando en el eje técnico-científico que es el coloreado en la [Figura 14.1](#). Según la USEPA, el proceso de la ERA se constituye a través de la caracterización de efectos y la caracterización de la exposición. Ambos componentes forman parte de tres fases:

1. La etapa de **formulación del problema** define claramente la problemática que se va abordar. Esta etapa identifica el alcance, la sustancia de interés y los receptores o entidades ecológicas de preocupación en la evaluación; como así también las rutas de exposición. Los supuestos y los criterios asociados para tomar decisiones deben estar claramente establecidos. Se deben considerar los puntos finales de evaluación apropiados; también las relaciones entre ellos y las mediciones. Esta etapa también debería incluir un *modelo conceptual del sitio* que identifica las rutas de exposición que vinculan el estresor a los receptores. El *modelo conceptual del sitio* es un componente clave de cualquier evaluación de riesgos que

integra los elementos de la evaluación para proporcionar un "diagrama de flujo" utilizado para lograr los objetivos planteados.

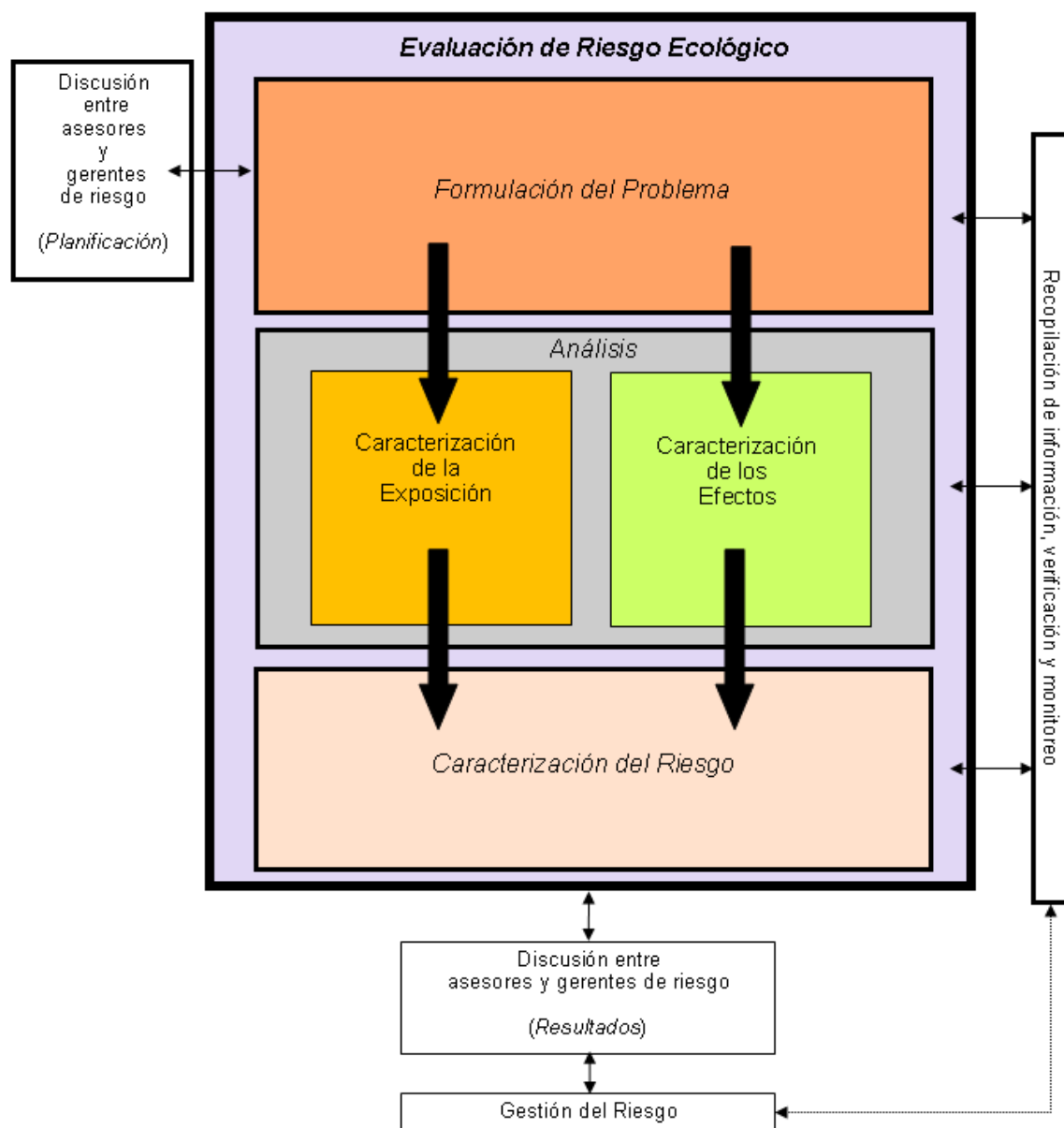


Figura 14.1. Estructura de la Evaluación de Riesgo Ecológico. Modificado a partir de USEPA (1998)

2. La **etapa de análisis del riesgo** incluye los análisis de los perfiles de *exposición* y de *efectos ecológicos*, cuantificando tanto (I) el grado de exposición *in situ* de los receptores o entidades ecológicas de preocupación a la sustancia de interés y (II) los efectos adversos asociados con la sustancia de interés:

- (I) Esta etapa cuantifica la exposición potencial de un receptor a la sustancia de interés en el sitio. Es importante identificar las vías de exposición relevantes y estimar la intensidad, frecuencia y duración de la exposición. Estos cálculos incluyen informa-

ción sobre la entidad o receptor y dependiendo de cuál sea este, la información necesaria (dieta, nivel trófico, hábitat, factores de bioacumulación, entre otros). La estrategia, en la mayoría de los casos, consiste en sobreestimar los niveles de exposición intencionalmente garantizando que la ERA sea conservativa.

- (II) Esta etapa cuantifica las relaciones entre la dosis o concentración de la sustancia de interés y la asociada con efectos biológicos agudos o crónicos sobre los receptores o entidades ecológicas. Estas estimaciones pueden basarse en estudios de laboratorio o de campo. Si las evaluaciones directas no están disponibles podrían utilizarse datos de un receptor similar al de preocupación o sustancias químicas similares a la sustancia de interés. Esto debe realizarse con el debido cuidado en el caso de las extrapolaciones correspondientes y explicitando claramente la razón de su uso.

3. La **caracterización del riesgo** integra la información de los efectos ecológicos y la información de exposición para evaluar el riesgo, con la posterior formulación de conclusiones y recomendaciones. En este punto el riesgo es estimado y caracterizado. Utilizando un enfoque basado en el peso de la evidencia se pueden evaluar los resultados de los pasos previos y formular una conclusión general. Estos enfoques abarcan desde decisiones relativamente cualitativas basadas en el juicio de expertos a decisiones más cuantitativas.

Las ERAs se llevan a cabo utilizando un enfoque en pasos o escalonado. El nivel inicial es una evaluación de tipo *screening* (búsqueda rápida) donde las suposiciones son muy conservadoras, considerándose niveles “seguros” y se utilizan datos genéricos del sitio. Los resultados que indican que no hay riesgo se aceptan solamente con un nivel alto de confianza, y la evaluación en este caso se considera completa. Por el contrario, si los resultados indican que existe riesgo aún con un nivel bajo de confianza la ERA avanzaría al siguiente nivel de evaluación. Al avanzar a niveles superiores en la ERA, lo conservativo se va reduciendo progresivamente utilizando datos más sitio-específicos y aumentando la complejidad de los abordajes para mejorar la confiabilidad de los resultados. Los niveles superiores de la ERA pueden utilizar modelos de mayor complejidad y enfoques probabilísticos. Incluso en estos niveles superiores, existe un grado de incertidumbre; la misma debe ser reconocida y puesta de manifiesto en la propia ERA.

Tipos de Evaluaciones

La aproximación al riesgo puede alcanzarse desde diferentes abordajes. El primer abordaje es generar sistemas de clasificación o *scoring* de sustancias, como en caso del USEPA *Hazard Ranking System*, en este caso solo se utiliza la información de la toxicidad sin información vinculada a la exposición ([Figura 14.2.a](#)). En un sentido estricto sería una escala basada en la toxicidad de la sustancia y no una escala de riesgo; sin embargo, este abordaje ha sido útil y ampliamente utilizado en la priorización de sustancias en normativas internacionales.

Por otro lado, cuando se integra la información de la exposición, además de la de efectos (toxicidad) la evaluación generalmente se realiza siguiendo uno de dos enfoques: determinístico

o probabilístico. El método más sencillo y ampliamente utilizado entre los dos mencionados es el determinístico. Para la sustancia de interés debería realizarse un cociente de riesgo (Figura 14.2.b). Estos cocientes comparan una concentración de efecto en relación a una concentración de exposición. En este enfoque se emplean supuestos conservadores y, en muchos casos, factores de seguridad para asegurar que se protejan los receptores o entidades ecológicas más sensibles. Estas herramientas son útiles para la detección efectiva de los receptores que claramente no están en riesgo y cuáles deben estudiarse con mayor detalle. Aunque normalmente se utiliza en evaluaciones de riesgo, estos cocientes en realidad no cuantifican realmente un riesgo y no hay que interpretar su valor como proporcional a la magnitud de este (Solomon et al, 2000).

Los enfoques probabilísticos caracterizan el riesgo utilizando distribuciones estadísticas para representar la variabilidad en los parámetros de entrada, como las concentraciones de la sustancia de interés y los efectos ecológicos adversos o puntos finales ecotoxicológicos (Figura 14.2.c). Simulaciones mediante computadores o modelos estadísticos se pueden utilizar para representar o predecir estas variables. La salida de una ERA probabilística es una distribución que refleja la incertidumbre asociada con las variables de entrada; esta distribución se asocia con el concepto formal de riesgo.

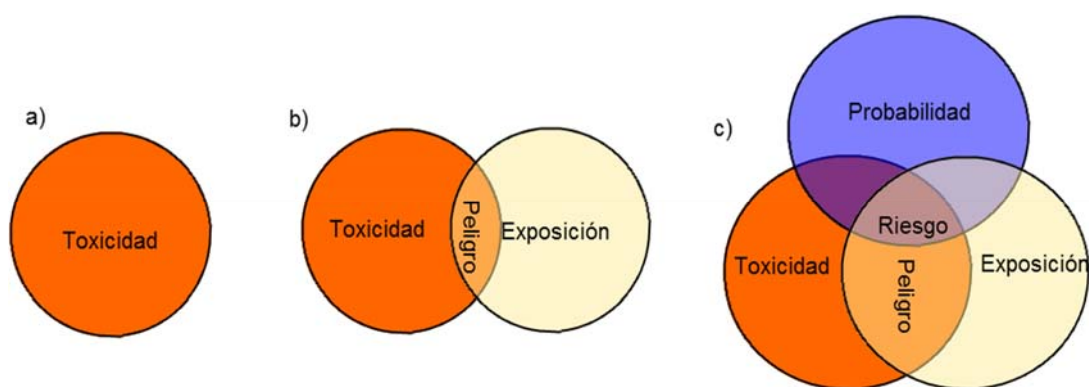


Figura 14.2. Tipos de enfoques para aproximar al riesgo. a) categorización de sustancias sin información de la exposición, b) enfoque determinístico mediante cocientes de exposición y toxicidad y c) enfoque probabilístico asociado con el concepto de riesgo.

Características de la Evaluación de Riesgos

Se conoce como Evaluación de Riesgo Ecológica al proceso de evaluar y cuantificar la probabilidad que un efecto adverso ocurra sobre los ecosistemas como resultado de un estresor o una combinación de estresores. Se evalúa el riesgo sobre los receptores de preocupación o entidades ecológicas de interés asociados con distintos estresores. La ERA puede ser utilizado en un contexto de peso de la evidencia para identificar los riesgos ambientales y para la gestión de estos. Por lo tanto, constituye una herramienta para la gestión de actividades humanas potencialmente generadoras de efectos no deseables sobre el medio, pudiéndose ser tanto de carácter prospectivo como retrospectivo.

Un estresor se refiere a cualquier entidad física, química o biológica u ocurrencia que causa o tiene el potencial de causar daño a los organismos vivos. El daño puede referirse a impactos directos o indirectos. Por ejemplo, una ERA que investigue el impacto de un plaguicida en las aguas superficiales puede evaluar las comunidades de macrófitas en busca de evidencia de cambios en la abundancia o diversidad que resulte directamente de la toxicidad del plaguicida. Además, la ERA puede examinar las comunidades de peces e invertebrados bentónicos en busca de evidencia de impactos indirectos, tales como la reducción de la abundancia o diversidad resultante de la pérdida de hábitat.

Una ERA es un proceso científico riguroso y exhaustivo utilizado para cuantificar la magnitud del riesgo atribuible a un factor estresante único o una combinación de factores de estrés en un lugar determinado. En su abordaje se pretende determinar la probabilidad de que un estresor genere o haya generado un efecto adverso sobre el ambiente, así como establecer las medidas adecuadas para su control. El objetivo final de este proceso es permitir a los gestores de riesgos identificar, priorizar y, en última instancia, gestionar los riesgos. La gestión del riesgo es un proceso distinto y separado mediante el cual se desarrollan e implementan estrategias para controlar, mitigar o manejar el riesgo. Los gestores de riesgos integran conclusiones y recomiendan acciones de una ERA con consideraciones técnicas y socioeconómicas para determinar si se requieren acciones correctivas y, de ser así, seleccionan las estrategias apropiadas.

El riesgo se define como la probabilidad que un evento no deseado ocurrirá. De esta manera el riesgo ecológico se refiere a la probabilidad de ocurrencia de un efecto ecológico no deseado. En la mayoría de los casos se considera la evaluación de las consecuencias de un evento no deseado conjuntamente con la estimación de su ocurrencia. Es fundamental conceptualizar el resultado del riesgo obtenido en una ERA en función de la situación considerada. El riesgo estimado siempre está dado en función del escenario de exposición y de efectos de la evaluación.

Formulación del problema

Es este punto se define claramente la naturaleza y objetivo de la ERA, de ahí se desprende su importancia. Describe las fuentes potenciales de riesgo (estresores) identificando los impactos ecológicos no deseados (puntos finales), considerando la naturaleza de los impactos ecológicos en relación a los estresores y produce un modelo conceptual del conjunto de la evaluación. En este punto los asesores de riesgo participan para definir entre las partes interesadas (*stakeholders*) los objetivos de la ERA. El modelo conceptual debe considerarse abierto a modificaciones vinculadas a cambios de objetivos y/o nueva información. No existe una manera única de realizar el modelo conceptual, aunque en muchas normativas existen ejemplos para tomar como modelos ([Figura 14.3.](#)).

Después de generar el modelo conceptual, la fase de formulación del problema continúa desarrollando un plan para implementarlo. Posteriormente se caracterizan los estresores, se identifican aspectos específicos de los efectos ecológicos de interés y cuáles serían los datos necesarios para la situación planteada, así también, como las medidas que podrían utilizarse para relacionar cuantitativamente los estresores con los efectos ecológicos esperados. En esta

etapa las partes implicadas realizan las sugerencias necesarias y son consideradas para incorporar en el modelo conceptual final. Una vez que finaliza esta etapa se continúa con el análisis que caracteriza la exposición al estresor y los efectos ecológicos de interés.



Figura 14.3. Modelo conceptual genérico. Los rectángulos naranjas son entidades y los óvalos azules procesos

Fase de Análisis

Caracterización de la Exposición

La exposición se caracteriza por identificar los procesos y mecanismos que ponen en contacto los organismos con los estresores de interés y cuantifican la magnitud, frecuencia y duración de este contacto. Para que exista riesgo debe existir contacto con el estresor, coincidir en tiempo y espacio. La naturaleza de los estresores y los distintos tipos de efectos ecológicos a evaluar influirán en el análisis de exposición. Cada estresor tendrá una escala espacio-temporal donde será relevante su análisis. Por ejemplo, un pequeño derrame tóxico puede ser local y a corto plazo, o el ingreso por escorrentía superficial de un plaguicida que se degrada rápidamente a un cuerpo de agua, también. En cambio, otro tipo de estresores pueden ejercer impactos ecológicos en grandes extensiones como el caso de un gran derrame por un buque petrolero con efectos a largo plazo sobre el ecosistema (Tabla 14.1).

La naturaleza de los estresores específicos otorga información sobre los procesos y mecanismos que deberían ser evaluados en un ERA. Los contaminantes químicos que se encuentran en el ambiente son transportados por las fases fluidas, agua y aire. Algunos pueden acumularse en los organismos y ser transmitidos a través de la red trófica. Algunos compuestos orgánicos son relativamente insolubles en agua y son adsorbidos en suelos y sedimentos, mientras otros se mantienen en solución y son posteriormente transportados con el agua. La caracterización de la exposición debería focalizarse sobre los fenómenos de transporte más que en los procesos físico-químicos.

Los tipos de efectos ecológicos incluidos en el modelo conceptual también pueden proporcionar información para el análisis de exposición. Los organismos ocupan ciertas dimensiones espacio-temporales. Los hábitats tienen una extensión espacial mensurable y los procesos ecológicos exhiben tasas características. Tales observaciones pueden servir de guía para el análisis de exposición (Tabla 14.1). Por ejemplo, el conocimiento del momento en que se produce una etapa sensible de un ciclo de vida (por ejemplo, huevos, larvas) y la

duración de la misma pueden focalizar la evaluación correspondiente de los estresores de interés y ser más significativa que cuantificar una exposición a largo plazo en un monitoreo que podría no contemplar el momento crítico del período de exposición. Del mismo modo, los cambios estacionales en la luz, la temperatura, la precipitación y otros factores físicos pueden dar lugar a variabilidad espacio-temporal en la exposición. El punto importante es contemplar esa variabilidad, y que tanto a partir de los procesos que influyen en el estresor, como de las características de las entidades ecológicas de interés, se tengan en consideración para abordar un análisis significativo de la exposición.

Tabla 14.1: Escalas de observación en la ERA. Ejemplos de entidades y funciones

Escala Espacial	Escala Temporal	Entidades	Funciones
Nivel Organismo (hasta m ²)	Horas-Días	Organismo	Supervivencia
			Crecimiento
			Reproducción
Microcosmos (hasta m ²)	Días-Meses	Organismo	Supervivencia
		Población	Crecimiento
		Comunidad	Producción
Campo (m ² -km ²)	Días-Años	Organismo	Supervivencia
		Población	Crecimiento
		Comunidad	Producción
Monitoreo Ambiental (m ² -km ²)	Años	Organismo	Supervivencia
		Población	Crecimiento
		Comunidad	Ciclado

Se pueden utilizar distintos enfoques de manera secuencial para evaluar la exposición. Se pueden desarrollar casos del “*peor-escenario*” que asuman valores máximos del estresor. Por ejemplo, las concentraciones de productos químicos tóxicos al final de un efluente se pueden usar sin tener en cuenta la dilución física, las alteraciones químicas o la degradación biológica que, de lo contrario, reduzca las concentraciones a las que realmente estarían expuestos los organismos de interés. Este enfoque está sesgado hacia la sobreestimación de la exposición y el riesgo. Si resultan riesgos aceptables de estas exposiciones extremas, la evaluación podría detenerse razonablemente. Las determinaciones analíticas del escenario de exposición son, sin duda, las más fáciles de defender científicamente (suponiendo un muestreo y un análisis correcto) y serían los aportes más realistas a una ERA. También la exposición puede estimarse usando modelos experimentales (por ejemplo, microcosmos, mesocosmos) o modelos matemáticos, estos últimos mayormente basados en las propiedades fisicoquímicas de las sustancias de interés.

La caracterización de la exposición conduce finalmente a un perfil de exposición. Para las sustancias químicas, el perfil incluye la naturaleza de la fuente, rutas de exposición, identificación de compartimentos ambientales de preocupación (por ejemplo, suelos, agua, sedimentos, biota),

estimaciones o medidas de las concentraciones de exposición (magnitud, tiempo, duración, recurrencia) e incertidumbres asociadas a estas concentraciones.

Caracterización de los Efectos

El número y diversidad de los diferentes tipos de efectos ecológicos, que son motivo de preocupación potencial, distinguen en parte al ERA de la evaluación más tradicional del riesgo para la salud humana. La diversidad de efectos refleja la naturaleza integral de la ecología y las ciencias ambientales. Los ecólogos han reconocido distintos niveles de organización que son útiles para describir el mundo natural. Estos niveles tradicionales incluyen organismos, poblaciones, comunidades y ecosistemas. Las ERAs comúnmente identifican más de un tipo de efecto ecológico de interés en la formulación del problema. Los efectos ecológicos de preocupación identificados durante la formulación del problema deben ser ecológicamente importantes, sensibles al estresor y relevantes para la gestión de riesgos.

Los puntos finales de evaluación son una expresión explícita de valores ambientales a proteger, definido operacionalmente sobre una entidad ecológica y sus atributos (Punto Final de Evaluación = entidad + atributo). Los puntos finales en la ERA pueden incluir distintos efectos a diferentes niveles de organización ([Tabla 14.2.](#)). Una ERA podría abordar modificaciones en procesos fisiológicos básicos (respiración, fotosíntesis) y los correspondientes efectos subletales (crecimiento) o letales sobre los organismos.

Las ERAs focalizan en muchos casos los impactos en las poblaciones. La dinámica de las poblaciones ha sido un tema de estudio ecológico por más de un siglo y no sorprende que los puntos finales a nivel de población se hayan convertido en algo convencional en la ERA. En la práctica, se evalúan los efectos sobre el tamaño poblacional de una o más especies de interés. Es frecuente que las especies oficialmente designadas como amenazadas o en peligro de extinción sean las seleccionadas para la ERA. Puntos finales a nivel poblacional incluyen, por ejemplo, reducciones en el tamaño de la población, tasa reproductiva disminuida, alteraciones genéticas y la probabilidad de extinción local. En el caso que las especies elegidas sean social o económicamente no deseables (plagas, especies invasoras, cianobacterias tóxicas), el punto final sería en sentido contrario, la probabilidad del aumento poblacional. Los modelos matemáticos de poblaciones tienen una larga historia de desarrollo y su inclusión en la ERA es cada vez más frecuente.

La teoría ecológica reconoce que las poblaciones individuales no persisten aisladas, digamos en un vacío ecológico. El número de especies, las abundancias relativas y absolutas, así como la coocurrencia espacio-temporal definen la estructura de la comunidad. Una variedad de metodologías ha sido desarrollada por ecólogos para describir esta estructura y alteraciones en la misma han sido incluidas como puntos finales de las ERAs. Estas alteraciones pueden incluir reducción en la diversidad o cambios en la estructura en respuesta al estresor de interés. Índices de integridad biótica y medidas de similitud entre comunidades se han introducido también en las ERAs.

La ecología sistémica aborda importantes mecanismos e interrelaciones entre procesos bióticos y abióticos que determinan la estructura y función del ecosistema. Los efectos de estresores en procesos fundamentales del ecosistema (producción primaria, respiración total del sistema,

descomposición, ciclo de nutrientes) son cada vez más importantes como puntos finales en las ERAs. El concepto de ecosistema también enfatiza la dependencia en función de la escala y la asimetría de las interacciones ecológicas. Incluso en sistemas muy complejos, no todos los componentes y procesos son de igual importancia. La delimitación de las escalas críticas y las relaciones de materia-energía en los ecosistemas pueden ayudar a definir las escalas espacio-temporales relevantes en el diseño de la ERA.

El reconocimiento de factores estresantes que operan a grandes escalas, como la lluvia ácida o el cambio climático, condujo a considerar los impactos a nivel de paisaje en la ERA. Los puntos finales a escala de paisaje en la evaluación de riesgos incluyen alteraciones en la distribución espacial y extensión de los diferentes tipos de hábitat dentro de los paisajes. Cambios en el tamaño, formas y la proximidad de áreas con hábitat similares (parches) pueden ser cuantificadas y modeladas.

Tabla 14.2: Ejemplos de puntos finales de evaluación genéricos en la ERA

<i>Entidad</i>	<i>Atributo</i>
Organismo	Tasas fisiológicas (fotosíntesis) Anormalidades Supervivencia Crecimiento Reproducción
Población	Tamaño poblacional Alteraciones genéticas Tasa reproductiva Extinción local
Comunidad y ecosistemas (ensambles)	Riqueza específica Abundancia Producción Área Función específica (ej remoción de sólidos) Estructura física

Relaciones Exposición-Respuesta

En esta sección de la metodología general de la ERA se desarrollan las relaciones funcionales entre los estresores y las respuestas ecológicas de interés. Las funciones exposición-respuesta son fundamentales para la ERA. Fundamentalmente, la ERA podría describirse como el desarrollo y la aplicación de las incertidumbres de las funciones de exposición-respuesta en la evaluación de los impactos ecológicos. Para un factor estresante dado, estas funciones estiman la severidad de la respuesta ecológica esperada en relación con la magnitud, frecuencia y duración de la exposición. La derivación de las funciones de exposición-respuesta depende de la cantidad y calidad de los datos disponibles.

Las fuentes de datos que podrían usarse en la construcción de estas funciones de exposición-respuesta incluyen: los resultados de bioensayos de toxicidad (agudos, crónicos) realizados bajo

condiciones controladas de laboratorio, medidas directas de exposición- respuesta en experimentos controlados de campo y la aplicación de relaciones estadísticas que estiman los efectos biológicos de sustancias químicas en base a las propiedades toxicológicas de las mismas. En ausencia de datos directos que sean relevantes, la relación exposición-respuesta utilizará extrapolaciones entre efectos ecológicos y/o sustancias similares con datos disponibles. En algunos casos los efectos serán extrapolados de especies estandarizadas a especies que son de interés en la evaluación, pero se carece de datos. De la misma manera, podría utilizarse datos disponibles de sustancias que tengan propiedades fisicoquímicas similares para extrapolar a una nueva sustancia sin datos experimentales (ej. QSAR).

Los mecanismos de acción (MoAs) implican reacciones bioquímicas específicas por los cuales las sustancias inducen efectos en los organismos. Los modos de acción son más generales y fenomenológicos; un modo de acción implica un resultado toxicológico común pero no necesariamente el mismo mecanismo subyacente. Hay que considerar que los términos mecanismo de acción y modo de acción no se usan de manera consistente en la literatura en muchos casos. Los MoAs son importantes en la evaluación del riesgo ecológico, porque las sustancias con un MoA común se espera que debieran comportarse de manera similar toxicológicamente, e incluso, podrían usarse indistintamente en algunos modelos que intentan predecir el efecto de mezclas de sustancias en el contexto de la ERA.

Las funciones de exposición-efecto (o exposición-respuesta) generalmente son no lineales, monotónicas y sigmoidales (Figura 14.4.); a excepción de algunos estresores en que se ha demostrado comportamientos que se apartan del descripto (ej, hormesis). Los análisis de las relaciones de exposición-efecto deben apuntar a modelar el cambio de la respuesta biológica en función de la exposición. Sin embargo, los resultados de las pruebas u observaciones se reducen mayormente a un punto que resume los resultados. La terminología para estos valores es inconsistente en la práctica y puede ser confusa. La intensidad de los estresores o agentes se define como concentración, ya que es la unidad más común en la evaluación de riesgos ecológicos. Sin embargo, se puede sustituir por la dosis, por el tiempo o por distintos niveles de la concentración.

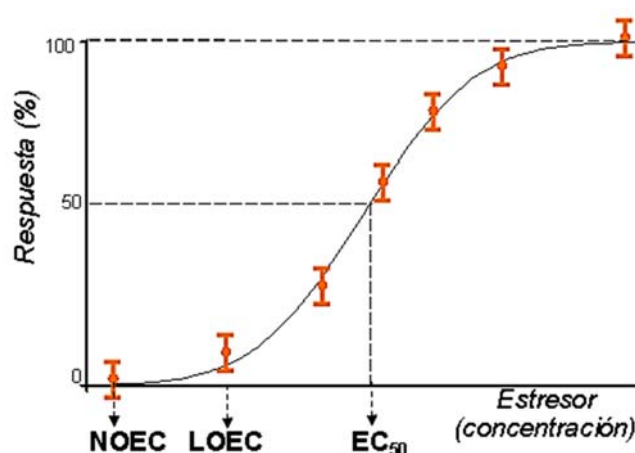


Figura 14.4: Relación Exposición-Respuesta. La línea continua negra es el modelo teórico, los puntos y las barras de error coloreadas son resultados experimentales. EC50, NOEC y LOEC definidos en el texto.

Si se ha utilizado el análisis de regresión para desarrollar un modelo que relacione la respuesta con la exposición, la estimación inversa puede derivar un nivel de exposición correspondiente a un nivel de efectos especificado. Para variables cuantales, aquellas que son proporciones de sujetos que muestran un rasgo dicotómico como supervivencia/muerte o presencia/ausencia, estos se denominan EC_p , la concentración que causa el efecto en la proporción p de organismos expuestos. La concentración letal mediana, LC_{50} , es una EC_p donde el valor de p es 0.5 y el efecto evaluado es la mortalidad. Para variables continuas, es frecuente utilizar la IC_p , la concentración que inhibe la respuesta en la proporción p .

Si se utilizan prueba de hipótesis generalmente se derivan dos puntos finales de prueba. El primero es la menor concentración que causa un efecto que es significativamente diferente (desde el punto de vista estadístico) del control o referencia, conocido como LOEC (*Lowest Observed Effects Concentration*). El segundo es la mayor concentración evaluada experimentalmente que está debajo del LOEC, que sería entonces la mayor concentración evaluada sin efecto observado, el NOEC (*No Observed Effects Concentration*).

Caracterización del Riesgo

La caracterización del riesgo implica la combinación de los perfiles de exposición con las relaciones exposición-respuesta para estimar los riesgos ecológicos en la ERA. Existen una variedad de métodos para la estimación del riesgo, estando su utilización condicionada a los datos obtenidos sobre exposición y efectos durante la fase anterior.

El método determinístico, conceptualmente, relaciona mediante un cociente una estimación puntual de la concentración de efecto (toxicidad) y una estimación puntual de la concentración de exposición de la sustancia de interés. Estas relaciones se conocen generalmente como cocientes de riesgo (RQ , *Risk Quotient*) o peligro (HQ , *Hazard Quotient*); dependiendo de las normativas, objetivo y tipo de las evaluaciones (prospectivas o retrospectivas), pero todas siguen el mismo abordaje conceptual.

El número de datos utilizados es bajo en general, por lo que se asocia un grado de incertidumbre en las estimaciones de este tipo (ej. escasez de parámetros y de especies ensayadas, valores genéricos de los modelos y variabilidad natural). Algunos autores adoptan el peor escenario posible para contrarrestar esta incertidumbre, basándose en el “principio precautorio”; utilizando la mayor concentración medida o estimada en el ambiente y la concentración de efecto del grupo más sensible de organismos. Para las sustancias químicas un método simple es dividir las concentraciones de exposición por los valores de referencia toxicológicos (TRV , *Toxicity Reference Values*). Por ejemplo, una LOEC o una LC_{50} son $TRVs$.

Entonces el cociente de riesgo ($RQ = \text{exposición/toxicidad}$) compara una concentración ambiental predicha o medida respecto a un valor de referencia ecotoxicológico. En cuanto a la terminología, se ha generalizado la de los ERAs europeos, que utilizan las siglas, PEC (*Predicted*

Environmental Concentration) y PNEC (*Predicted No-Effect Concentration*), para las concentraciones de exposición y efectos para el cálculo del cociente, respectivamente. Los cocientes iguales o mayores a 1 implicarían la posibilidad de riesgo y deberían evaluarse de manera más detallada; cocientes menores a 1 serían el caso contrario. En este enfoque se emplean supuestos conservadores y, en muchos casos, factores de seguridad para asegurar que se protejan los receptores o entidades ecológicas más sensibles (por ejemplo: 10, 100 o 1000 según la extrapolación sea mayor entre el dato utilizado y lo que se desea evaluar/proteger).

Estos cocientes son útiles en las primeras fases de evaluación para reducir el número de estresores o receptores ecológicos a evaluar con mayor detalle, a modo de *screening*, considerando que tiene un sesgo hacia sobreestimar el riesgo. Su valor sirve como herramienta de aproximación al riesgo, aunque *sensu stricto* representa un peligro, dado que no se asocia con una probabilidad de ocurrencia. Su uso asume que las condiciones de exposición y efecto evaluadas se dan en todo momento y en todo lugar y, como se dijo previamente, no hay que interpretar su valor como proporcional al riesgo. En algunos casos las agencias ambientales generan niveles de preocupación (LOCs, *Levels Of Concern*) para ser comparados con los cocientes obtenidos y decidir las acciones regulatorias.

Si el cociente es mayor a la unidad la mayoría de las normativas recomiendan un análisis probabilístico de los escenarios de exposición y efecto, dado que disminuye la incertidumbre respecto a los cocientes mencionados. Los métodos probabilísticos para la Evaluación de Riesgo Ecológico (PERA, *Probabilistic Ecologic Risk Assessment*) se recomiendan para niveles superiores en el proceso de la ERA. Estos métodos utilizan Distribuciones de Sensibilidad de Especies (SSD, *Species Sensitivity Distribution*) de manera conjunta con la Distribuciones de las Concentraciones de Exposición (ECD, *Environmental Concentration Distribution*) para describir el riesgo de efectos adversos. La ventaja de la PERA es que utiliza toda la información pertinente de los datos de toxicidad sobre distintas especies y, cuando se combina con distribuciones de la exposición, permite estimaciones cuantitativas de los riesgos.

El supuesto básico de la SSD es que la sensibilidad frente a un tóxico de un conjunto de especies puede ser descrito por una distribución de probabilidad. Se podría definir la SSD como una distribución estadística que describe la variación de la toxicidad entre un conjunto de especies para una determinada sustancia. Cuando se habla de conjunto de especies nos referimos a un taxón específico, un ensamble de especies o una comunidad natural. Dado que no conocemos la verdadera distribución de los puntos finales de toxicidad, la SSD es estimada a partir de una muestra y visualizada como una función de distribución acumulada que es la integral de una función de densidad de probabilidad (Figura 14.5.). La curva acumulada sigue la distribución de los datos de sensibilidad obtenidos de pruebas ecotoxicológicas, con concentraciones de efecto derivadas de pruebas de toxicidad agudas o crónicas, por ejemplo, valores de LC_{50} o NOEC, respectivamente.

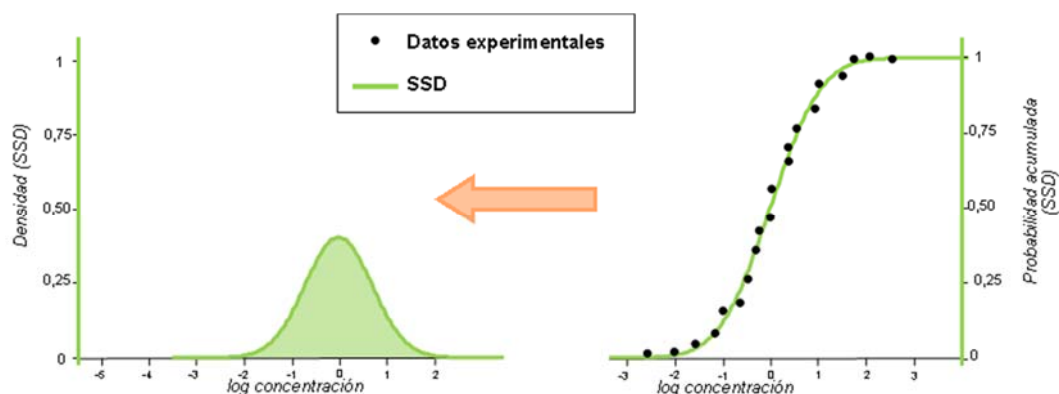


Figura 14.5: SSD. Generación de la SSD acumulada teórica a partir de datos experimentales (derecha) y la SSD como función de densidad (izquierda).

En primera instancia se utilizó esta metodología para la evaluación de riesgos prospectivos para generar Criterios de Calidad Ambiental ante la demanda de la sociedad de niveles “seguros” de contaminantes. Se utilizó para el cálculo de concentraciones peligrosas (HC: *Hazardous Concentrations*), concentración de la sustancia que afecta a una proporción (p) de las especies (HC p). El valor de corte de 5% de especies de la cola izquierda de la distribución (HC₅), se ha utilizado tradicionalmente para obtener concentraciones ambientales seguras, bajo el supuesto de que los ecosistemas pueden tolerar un cierto grado de estrés químico. Entonces con un objetivo de protección, que generalmente era el de proteger el 95% de las especies, se utilizó habitualmente el HC₅, aquella concentración ambiental del contaminante de interés que afectaría el 5% de las especies. De modo general se habla de HC p siendo p el valor de porcentaje de afectación aceptado como objetivo de protección (Figura 14.6.).

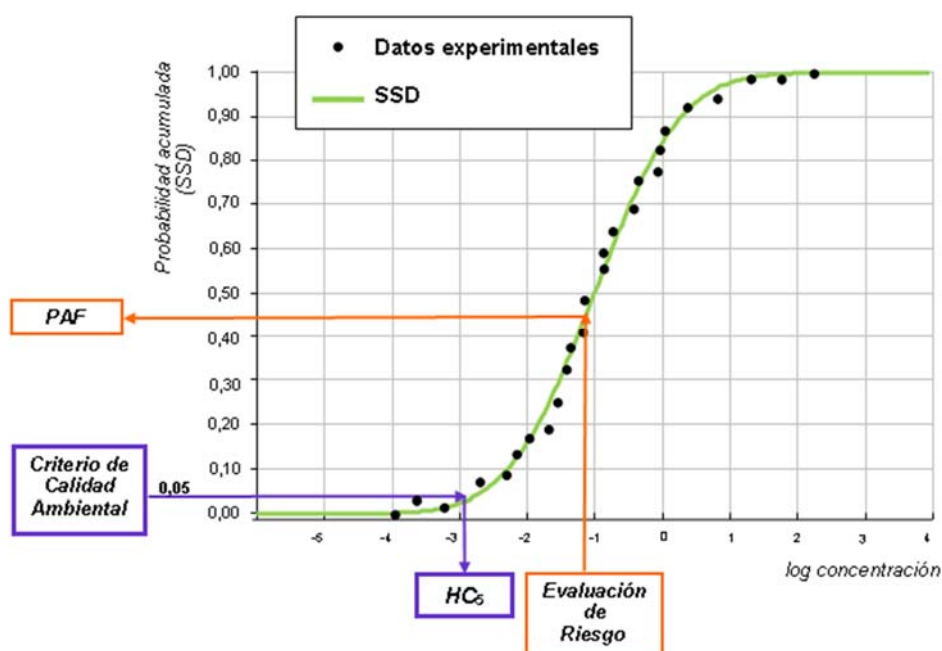


Figura 14.6. SSD: aplicación en el contexto de la ERA y la generación de Criterios de Calidad Ambiental. PAF: Porcentaje potencialmente afectado (*Potentially Affected Fraction*). HC₅: concentración de riesgo (*Hazardous Concentrations*) 5%

Posteriormente se utilizó esta herramienta en el contexto de la ERA, siguiendo el camino inverso, dada una concentración ambiental cuál sería la fracción afectada; en este caso se encuentra implícito el concepto de riesgo. La fracción de especies afectadas (*eje y*) que es obtenida a partir de la SSD para una concentración ambiental (*eje x*) dada se conoce como PAF (*Potentially Affected Fraction*) de las especies y es utilizada como una medida de riesgo ecológico. Una forma de conceptualizarlo es considerarla la fracción de especies, dentro del conjunto de especies utilizada para la construcción de la SSD, que se espera sea (potencialmente) afectada sobre su nivel de no-efecto a una concentración ambiental dada.

Como se dijo previamente para la construcción de la SSD se pueden utilizar datos experimentales de especies de un taxón específico, un ensamble de especies o una comunidad natural. El número y tipo de datos con los cuales se construye es relevante para derivar la SSD y las conclusiones que se obtienen a partir de la misma. Estos datos deberían ser ecológicamente y estadísticamente representativos, pero siempre está la restricción de los datos disponibles. En el caso de la generación de criterios de calidad ambiental los datos crónicos de toxicidad son preferibles y en muchas normas se establece una diversidad taxonómica mínima. En la ERA frecuentemente se utilizan más datos de toxicidad aguda dado la abundancia en relación a los crónicos. Es importante el criterio para seleccionar los datos de toxicidad para generar la SSD dado que si se seleccionan datos incorrectos se invalida las conclusiones que de ahí se generen. El ensamble taxonómico (vertebrados, invertebrados, organismos fotosintéticos) utilizado para construir la SSD tiene una influencia significativa en la evaluación.

Siguiendo criterios estadísticos se podrían ajustar distintos modelos teóricos de probabilidad a los datos empíricos, siendo los más utilizados, la distribución normal, logística y log-normal. Esta última de mucha tradición de uso en las ciencias ambientales para describir concentraciones ambientales que en general presentan distribuciones sesgadas hacia la derecha; por esa razón al aplicar logaritmo ese sesgo se corrige y se aproxima a una distribución normal siendo frecuentemente utilizada en la ERA. Otros abordajes no implican una distribución estadística definida, pero son necesarias herramientas informáticas para poder realizarlas.

Como todo abordaje metodológico, la SSD tiene sus limitaciones y críticas. Por un lado, se intenta con pocos datos de laboratorio generar estimaciones para una gran cantidad de especies en el ecosistema. Por otra parte, no se utiliza información asociada con la estructura y función de la comunidad biológica; las interacciones no son consideradas. Y por último se considera que todas las especies tienen la misma importancia, teniendo evidencia desde la teoría ecológica que esto no es así dentro de una comunidad. Por estas razones se han generado distintos estudios para validar la herramienta metodológica, verificando predicciones de las SSD en mesocosmos y en estudios de campo para distintas sustancias, como por ejemplo el endosulfán.

Además del enfoque de la SSD, experimentos en laboratorio o bajo condiciones controladas de campo (por ejemplo, microcosmos, mesocosmos) se pueden utilizar para caracterizar riesgos ecológicos. Los sistemas experimentales brindan oportunidades para exponer sobre las unidades ecológicas de interés los estresores. Tales experimentos pueden ser el único método práctico para evaluar los riesgos planteados por estresores no considerados previamente. Este enfoque también puede resultar esencial en la evaluación de los riesgos planteados por interacciones con factores que son desconocidos. El modelado y la simulación computacional pueden ser usados también para estimar riesgos ecológicos. Tras décadas de construcción de modelos de investigación ecológica es lógico que algunos de estos puedan resultar útiles para estimar los riesgos planteados por diversos estresores en organismos, poblaciones, comunidades y ecosistemas. Para ser útiles estos en la caracterización del riesgo, el modelo debe incluir como variables dependientes al menos algún punto final de evaluación e incluir al estresor como una variable independiente. Un aspecto crítico en la selección de modelos sería la capacidad para derivar relaciones exposición-función entre el estresor y los impactos ecológicos de interés.

Si pensamos en los escenarios de exposición y efectos no como un punto (lo que hacemos al utilizar el cociente) sino como variables aleatorias, obtenemos una caracterización del riesgo probabilística que se basa en el solapamiento de ambas. De la misma manera que obtuvimos una SSD para caracterizar el escenario de efectos, por analogía podemos pensar en el escenario de exposición. Para esto se construye una ECD a partir de los valores medidos o estimados en el ambiente.

Una vez que se tienen ambas distribuciones, ECD y SSD, se podría incluir en el mismo gráfico, considerando que se debe expresar las abscisas de cada distribución en las mismas unidades de concentración y en la misma escala. En la [Figura 14.7](#), de arriba hacia abajo se observan mayores solapamientos entre el escenario de exposición y el escenario de efectos. Intuitivamente, aunque se puede demostrar formalmente, se puede observar que el grado de solapamiento entre las distribuciones de la ECD y la SSD cuantificaría el riesgo. Hay que dejar en claro que las ECD y SSD podrían tener cualquier tipo de distribución de probabilidad y que no necesariamente deberían ser la misma distribución, pero el concepto subyacente para la interpretación es el mismo.

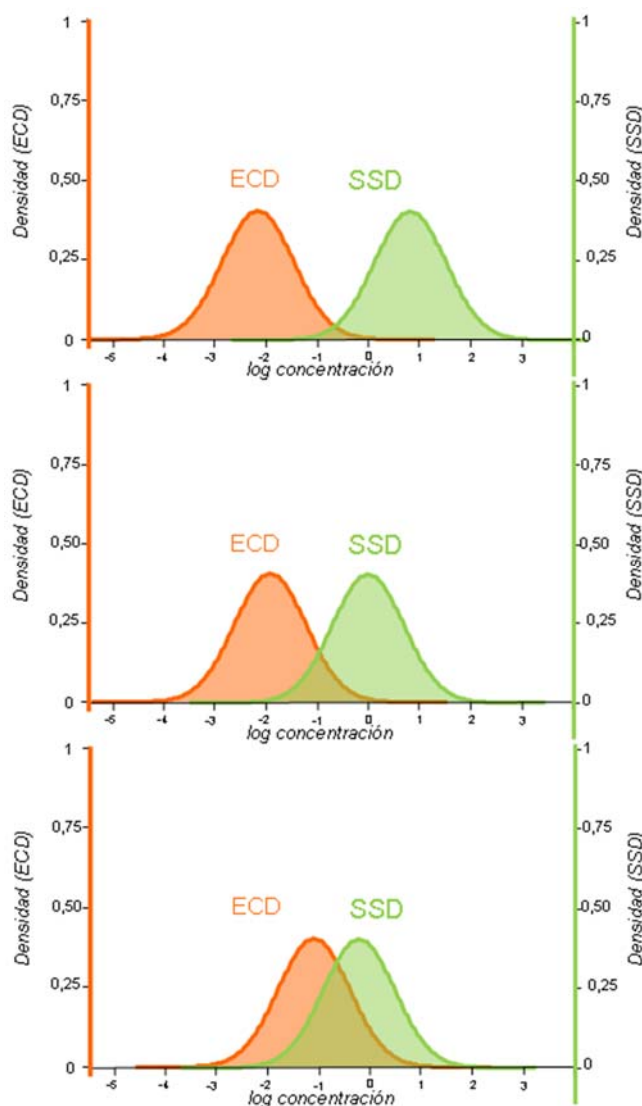


Figura 14.7: Distribuciones de Exposición (ECD) y de Efecto (SSD). De arriba hacia abajo se dan escenarios de mayor riesgo que se visualizan como un mayor solapamiento entre las distribuciones de probabilidad.

A partir de las funciones de densidad ECD y SSD se pueden generar, utilizando como paso intermedio las distribuciones acumuladas de las mismas, lo que se conoce como Curva de Probabilidad Conjunta (JPC, *Joint Probability Curve*) como se muestra en la [Figura 14.8.a](#). Existen diferentes estilos de presentar estos gráficos, pero conceptualmente todos se construyen a partir de dos distribuciones (ECD y SSD) que están parametrizadas del mismo modo, en el caso ejemplificado mediante $\log(\text{concentración})$. En estos tipos de gráfico visualizamos conjuntamente los escenarios de exposición y efectos. En nuestro caso se generó un Gráfico de Perfil Acumulado (CPP, *Cumulative Perfil Plot*) donde el eje y tiene los valores de PAF acumulado de la SSD y el eje x los valores acumulados de la ECD. Otra JPC muy utilizada es el Gráfico de Perfil de Excedencia (EPP, *Exceedence Perfil Plot*) donde el eje y grafica la excedencia (1- ECD acumulada) y el eje de las x tiene los valores acumulados de la SSD ([Figura 14.8.b](#)).

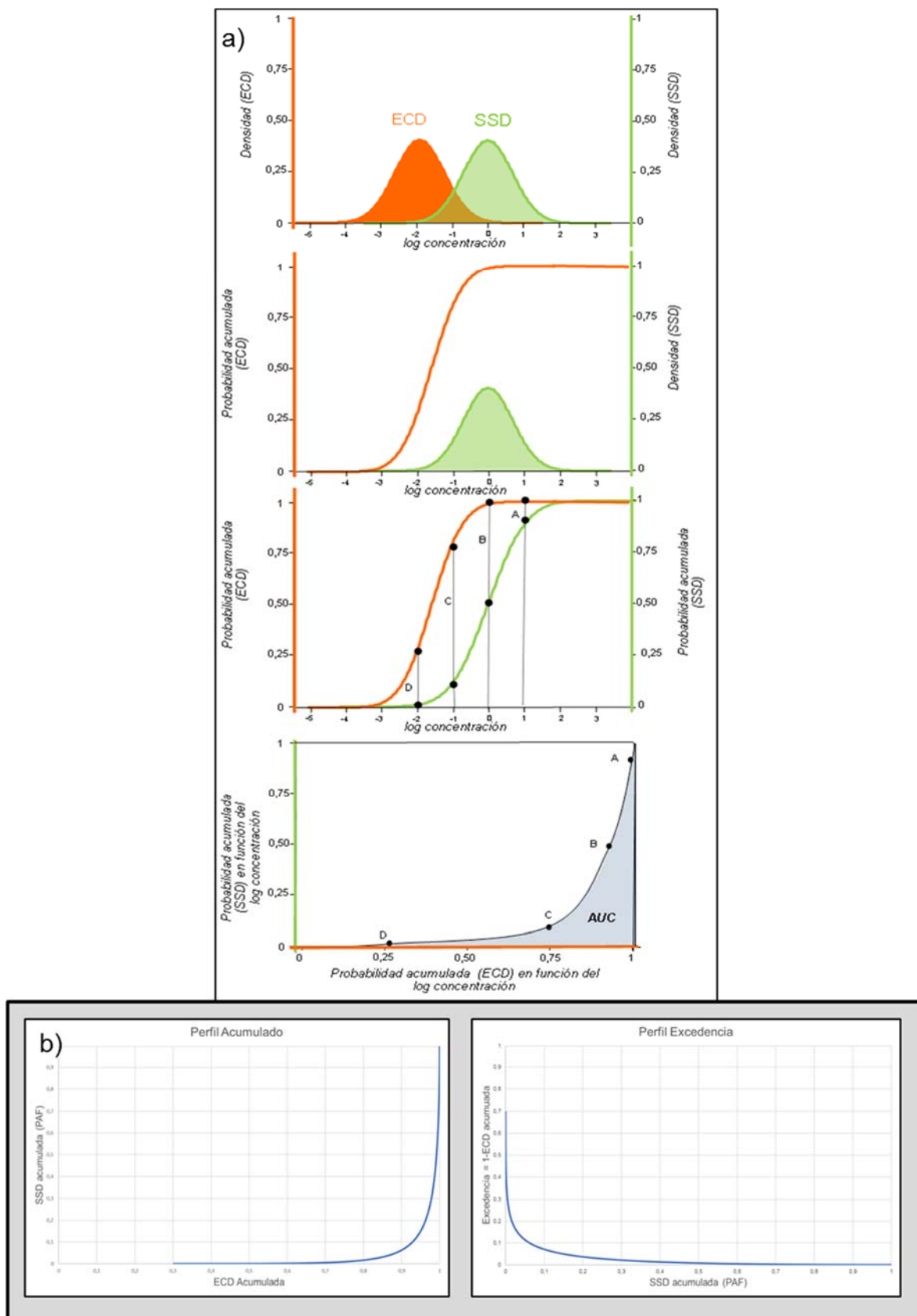


Figura 14.8. Curva de Probabilidad Conjunta. a) Generación: Naranja: ECD - Escenario de Exposición. Verde: SSD - Escenario de Efecto. Gris: AUC – Area Bajo la Curva, b) Tipos: Gráfico de Perfil Acumulado (Izquierda) y Gráfico de Perfil de Excedencia (derecha)

Estos tipos de gráfico son frecuentemente utilizados para la comunicación del riesgo. El Área Bajo la Curva (AUC, *Area Under Curve*) de una JPC se considera una medida numérica del Riesgo Ecológico total de la sustancia que un administrador de riesgos intentará minimizar. En las JPC de la [Figura 14.8.b](#) las AUC son idénticas. Cuanto mayor sea el AUC, mayor será el Riesgo Ecológico, mientras que la forma de la curva permite diferenciar entre un evento de efecto adverso severo con baja probabilidad de ocurrencia y un evento de efecto adverso leve con alta probabilidad de ocurrencia. Considerando JCP-CPP, como se ve en la [Figura 14.9](#). (superior), el punto A y el B son dos escenarios contrastantes. El punto A se asocia a un escenario de efectos adversos severos altamente probable. Para conceptualizar esto pensemos que un PAF de 0,75 implica que el 75% de las especies utilizadas para construir la SSD se verían afectadas; y ese escenario de efectos se asocia con un valor de 0,25 de la ECD acumulada o 0,75 de excedencia. Esto implica que se daría al menos el 25% de las veces encontrar valores de concentraciones ambientales que afecten al menos el 75% de las especies. Otra manera de interpretarlo es que el 75% de las especies serán afectadas y esta proporción de efecto se presentaría en el 75% (0,75 de excedencia) de los casos en los escenarios evaluados. En el caso del punto B el razonamiento análogo lleva a la conclusión inversa.

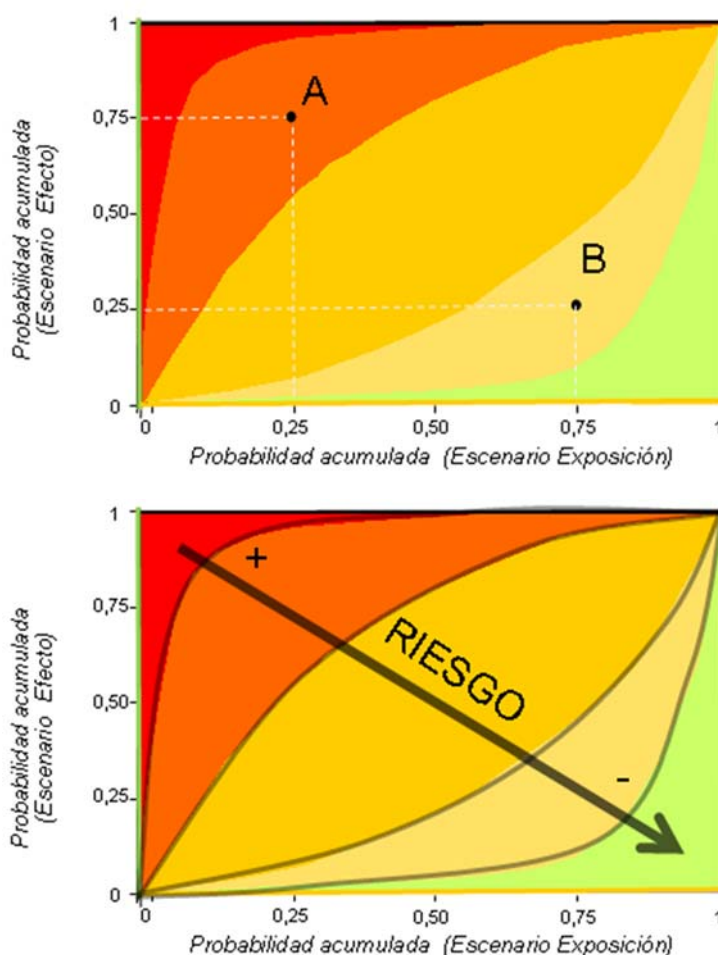


Figura 14.9. Curva de Probabilidad Conjunta (JPC). Escenarios de mayor (rojo) a menor (verde) riesgo y su relación con el área bajo la curva.

De esta manera se puede pensar en el gradiente de mayor a menor riesgo con solo visualizar las distintas curvas (Figura 14.9., inferior). Además de la visualización como se dijo previamente el AUC de la curva generada es una medida del Riesgo Ecológico. Para calcular el riesgo el problema a resolver sería evaluar la probabilidad que el valor de la concentración de exposición (EC, *Environmental Concentration*) sea mayor a la concentración de efecto (SS, *Species Sensitivity*):

$$\Pr(\log EC > \log SS)$$

Si ECD y la SSD son ambas distribuciones normales, se puede utilizar un resultado conocido de la teoría de probabilidades para la diferencia de dos variables aleatorias independientes y normalmente distribuidas (X_1 y X_2).

$$\Pr(\log EC > \log SS) = \Pr(X_1 > X_2) = \Pr(X_1 - X_2 > 0)$$

Siendo $(X_1 - X_2)$ normalmente distribuida con media $\mu_{(X_1 - X_2)} = \mu_1 - \mu_2$ y desvío estándar $\sigma_{(X_1 - X_2)} = \sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}$; entonces

$$\Pr(X_1 > X_2) = \Phi\left(\frac{\mu_1 - \mu_2}{\sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}}\right)$$

Siendo Φ la función acumulada normal estándar, $X_1 = \log EC$, con sus parámetros μ_1 y σ_1 y $X_2 = \log SS$, con sus parámetros μ_2 y σ_2 . El valor obtenido estará en el intervalo $[0,1]$ consistente con una definición probabilística del riesgo y permitirá cuantificarlo para la situación evaluada. Se puede demostrar que coincide numéricamente con la AUC. Hay que considerar que la relación entre el grado de solapamiento entre las distribuciones (ECD y SSD), el AUC de la Curva de Probabilidad Conjunta y su valor numérico como medida del Riesgo Ecológico se verifica aún si las distribuciones no fueran normales.

El riesgo implica incertidumbre. La ERA fue diseñada para incluir la incertidumbre como un componente integral del proceso de evaluación. Las fuentes de incertidumbre incluyen la variabilidad natural en los fenómenos ecológicos y ambientales, como así el sesgo y la imprecisión asociados con las funciones exposición-respuesta. Esta última fuente de incertidumbre aumenta si las funciones derivadas implicaban extrapolaciones, como por ejemplo laboratorio-campo o especie-especie. El conocimiento incompleto de los fenómenos ecológicos incorpora también incertidumbre a la ERA:

Las incertidumbres inherentes al proceso de la ERA pueden describirse cuantitativamente usando, por ejemplo, intervalos o distribuciones estadísticas. Estos métodos disponibles propagan esta incertidumbre a través del proceso de estimación de riesgo y, algunas alternativas computacionalmente intensivas trabajan directamente desde los datos y propagan la incertidumbre en el análisis. Estos métodos incorporan la incertidumbre incorporándola al análisis de manera consistente con una definición probabilística del riesgo. Los análisis numéricos de sensibilidad e incertidumbre pueden utilizarse para examinar la incertidumbre e identificar las fuentes claves de sesgo e imprecisión en la estimación cuantitativa del riesgo. Al identificarse estas fuentes se pueden focalizar los recursos y asignarlos de manera eficiente

para obtener nuevos datos y generar nuevas estimaciones para reducir la incertidumbre. Este ciclo puede repetirse hasta un nivel considerado aceptable o hasta que no pueda ser reducida la incertidumbre.

Un punto a relevante es no confundir incertidumbre con variabilidad. La primera se relaciona con el desconocimiento del sistema, la segunda es una propiedad de un conjunto de entidades que difieren entre ellas. Modelados más avanzados separan estos dos conceptos en los resultados.

De manera general la caracterización del riesgo para la ERA consiste en integrar la información disponible sobre exposición y efectos, siempre considerando la incertidumbre, ponderar la evidencia y presentar las conclusiones en una forma apropiada para el administrador de riesgos y las partes interesadas. La integración de la información de exposición y efectos debe llevarse a cabo para cada línea de evidencia independiente para que las implicaciones de cada uno se presenten explícitamente.

Ejemplo simplificado de una ERA

El siguiente ejemplo intenta acercar el abordaje, secuencia de pasos y criterios a explicitar en una ERA. Seguramente la intención didáctica que tiene el siguiente apartado es a costa de una simplificación. Gran parte del trabajo de una ERA consiste en la búsqueda, ordenamiento y tabulación de información; con sustancias donde el conocimiento es amplio la tarea mencionada es realmente grande. Las referencias de la información utilizada, propiedades de la sustancia, destino ambiental, criterios adoptados para la caracterización del riesgo y líneas de evidencia no presentadas en el presente ejemplo pueden encontrarse en Giesy & Solomon (2014) y Demetrio (2012).

Formulación del problema

En la región de estudio existen cultivos que utilizan distintos plaguicidas para su manejo y en función de los volúmenes de uso se seleccionó como sustancia a evaluar el insecticida organofosforado clorpirifos (CAS 2921-88-2) para estimar los riesgos ecológicos asociados a cuerpos de aguas superficiales próximos a producciones donde existe aplicación de este.

Se han realizado monitoreos en cuerpos de agua de la región en eventos de post-aplicación del insecticida, evaluaciones del decaimiento del insecticida y determinado concentraciones en la escurrentía de parcelas experimentales. Los resultados en la región están en línea con lo observado a nivel internacional que reportan exposiciones episódicas de menos de 2 días de duración. Partiendo de la aplicación en cultivos, las principales rutas potenciales de exposición a organismos acuáticos son la escurrentía superficial y la erosión, con aportes menores mediante deriva. A partir de los resultados mencionados se decidió que el escenario

a evaluar es el de exposición aguda asociado a pulsos de entrada de los plaguicidas al cuerpo de agua, debido a la aplicación o escorrentías superficiales posteriores provocadas por precipitaciones. La vía de exposición a evaluar es el contacto directo desde el agua (Figura 14.10).

El clorpirifos ejerce su acción biológica produciendo inhibición irreversible de la acetilcolinesterasa, generando que la acetilcolina no se libere del sitio receptor y el impulso nervioso se mantenga permanentemente, resultando este exceso en parálisis y finalmente la muerte del organismo. Dentro de los animales, los artrópodos son los reportados como los organismos más sensibles. Los productores primarios, que carecen de la enzima, presentan efectos directos con concentraciones de exposición mayores.

Los invertebrados, que incluyen los artrópodos acuáticos, son el receptor ecológico seleccionado por ser los organismos más sensibles al clorpirifós. El punto final de evaluación es la disminución de la supervivencia de los invertebrados acuáticos. Hay que destacar al grupo como de alta relevancia ecológica en las comunidades acuáticas y se asume que su protección mantendrá la integridad del ecosistema.

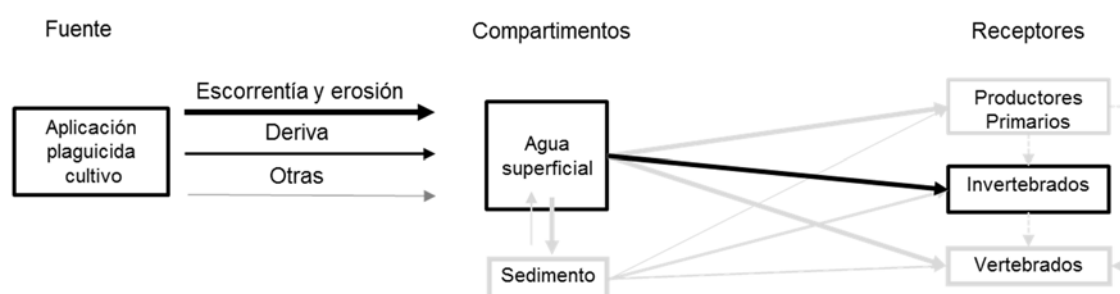


Figura 14.10: Modelo Conceptual: Las flechas en negro son las de interés para la presente evaluación. El ancho de las flechas es relativo a la importancia en la exposición.

A partir del modelo conceptual propuesto (Figura 14.10) el plan de análisis comprende generar perfiles de exposición utilizando concentraciones en cuerpos de agua post-aplicación/escorrentía, y perfiles de efectos, utilizando valores de bioensayos de toxicidad en laboratorio. Se realizará con estos perfiles una caracterización del riesgo mediante cocientes y posteriormente una evaluación probabilística.

Fase de Análisis

Caracterización de la exposición

Para caracterizar el escenario de exposición a partir de los trabajos mencionados se realizó una estadística descriptiva de los valores medidos (EC: *Environmental Concentration*) en las

aguas de la región (Tabla 14.3). Se observan que para escenarios agudos post-aplicación/esco-rrentía el valor máximo es de 10,8 µg/l que sería considerado el “peor escenario”. La relación entre la media y la mediana sugieren una distribución de tipo log-normal, frecuente de encontrar en las concentraciones de xenobióticos en el ambiente.

Tabla 14.3: Estadísticos descriptivos utilizados para generar el escenario de exposición (EC) para clorpirifós (µg/l)

n	Mínimo	Máximo	1° Cuartil	Mediana	3° Cuartil	Media
19	0,014	10,8	0,39	0,95	2	2,37

Caracterización de los efectos

Para caracterizar el escenario de efectos (SS: *Species Sensitivity*) se obtuvieron valores de LC₅₀ de ensayos agudos (≤ 96 hs), consistente con el escenario de exposición planteado, para invertebrados acuáticos de agua dulce a partir de la base de datos ECOTOX (n: 110). Se presentan los valores de las especies (autóctonas y no) más sensibles para utilizar en la evaluación (Tabla 14.4).

Tabla 14.4: Datos de las especies de invertebrados más sensibles al clorpirifós (µg/l)

Especie	Autóctona	LC ₅₀ (µg/l)	Tiempo (h)
<i>Daphnia ambigua</i>	No	0,035	48
<i>Hyallela curvispina</i>	Si	0,060	48
<i>Daphnia magna</i>	No	0,100	48
<i>Palaemonetes argentinus</i>	Si	0,490	24

Caracterización del riesgo

Abordaje Determinístico

Se calcularon los cocientes de riesgo, entre la concentración máxima (“peor-escenario” RQ_{max}) y mediana (RQ_{med}) respecto al valor de referencia de toxicidad para el grupo de invertebrados; el VRT seleccionado fue el menor valor de LC50 informado para el grupo (Tabla 14.5).

Tabla 14.5: Cocientes de Riesgo

		Efectos	Exposición		RQ_{max}	RQ_{med}
		<i>LC₅₀ (µg/l)</i>	<i>agua superficial (µg/l)</i>			
<i>Especie</i>	<i>Autóctona</i>		<i>máxima</i>	<i>mediana</i>		
<i>Daphnia ambigua</i>	No	0,035	10,8	0,95	309	27
<i>Hyalella curvispina</i>	Si	0,060	10,8	0,95	180	16

El cociente mayor a la unidad en todos los casos implicaría riesgo para efectos agudos sobre los invertebrados en los escenarios de exposición planteados. Este método supone que las concentraciones en el ambiente no cambian en el tiempo y el espacio y que los datos relacionados con el efecto son los adecuados para ser extrapolados directamente al campo. Si bien el cociente para caracterizar el riesgo fue construido pensando en una condición de “peor-escenario” (RQ_{max}), hay que destacar que aún con los valores medios (RQ_{med}) de la concentración de clorpirifos el cociente implicaría riesgo. Los valores de RQ obtenidos sobrepasan los valores de LOC de la USEPA indicando potencial riesgo agudo en organismo acuáticos.

Abordaje Probabilístico

Para este tipo de análisis se consideran la EC y la SS variables aleatorias; y siguiendo los lineamientos de cálculos vistos previamente consideraremos a las mismas como variables normalmente distribuidas. Por esta razón este supuesto debe verificarse, sino los cálculos asociados al riesgo no serían válidos. Se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks siendo la hipótesis nula (H₀) que las observaciones tienen distribución normal y la alternativa (H₁) que las observaciones no tienen distribución normal; obteniendo el estadístico de la prueba (W) y el valor de *p* asociado.

Se construyeron a partir de los datos de EC y SS las distribuciones log-normales y se verificó si posterior a la transformación ajustaban a una distribución normal.

Tabla 14.5: Cantidad de datos, media, desvío estándar, estadístico de Wilks y valor de *p* asociado para la generación de la ECD y SSD

<i>Variable</i>	<i>n</i>	<i>Media</i>	<i>D.E.</i>	<i>Wilks</i>	<i>p</i>
log EC	19	-0,0832	0,7475	0,9409	0,5067
log SS	110	0,3361	0,7621	0,9699	0,1362

A partir de los datos de EC (Tabla 14.3.) se generó la ECD log-normal y se estimó mediante 19 datos de concentraciones medidas en cuerpos de agua de la región, teniendo una media de -0,0832 y un desvío estándar de 0,7445; la prueba de normalidad tuvo un $p > 0,05$ por lo que no hay evidencia para rechazar H_0 .

A partir de los datos de SS (Tabla 14.5.) se generó la SSD log-normal (Figura 14.11.) y se estimó mediante 110 datos de LC_{50} con las restricciones mencionadas previamente obteniendo una media de 0,3361 y un desvío estándar de 0,7621; como en el caso de la ECD la prueba de normalidad tuvo un $p > 0,05$ por lo que no hay evidencia para rechazar H_0 . A partir de la SSD se estimó la HC_5 en 0,119 $\mu\text{g/l}$ ($LI_{90\%} = 0,075 \mu\text{g/l}$ - $LS_{90\%} = 0,178 \mu\text{g/l}$) y la HC_{50} en 1,642 $\mu\text{g/l}$ ($LI_{90\%} = 2,168 \mu\text{g/l}$ - $LS_{90\%} = 2,862 \mu\text{g/l}$). De la Tabla 14.3 se observa que la mediana de EC $>$ HC_5 implicando un potencial riesgo.

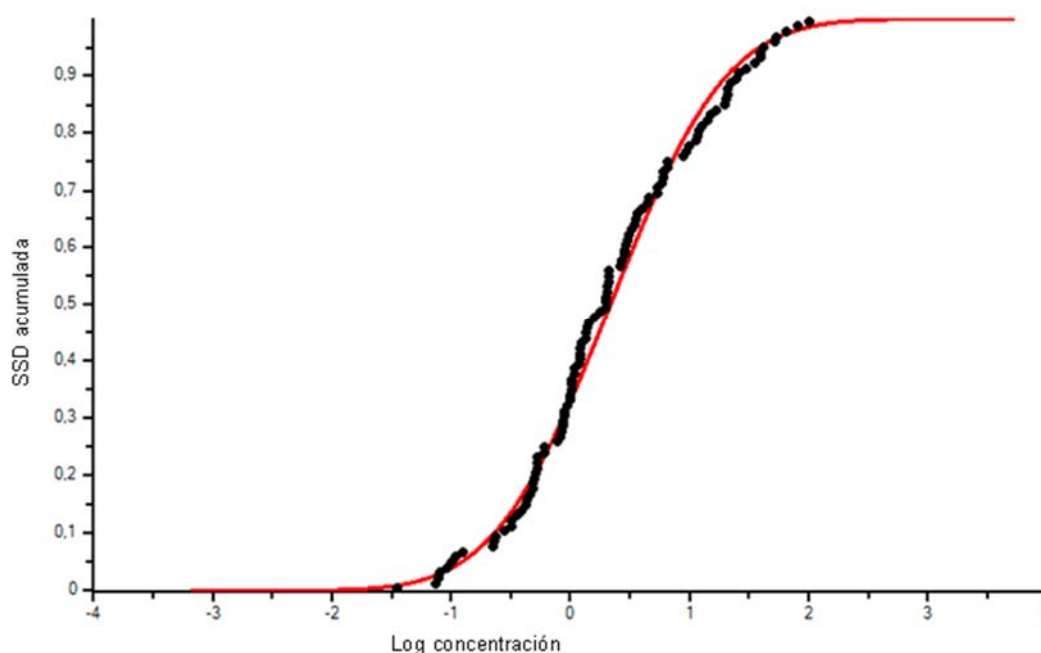


Figura 14.11: SSD generada para invertebrados

Dado que tanto la ECD y la SSD verificaron el supuesto normalidad se calculó el Riesgo Ecológico

$$Pr(X_1 > X_2) = \Phi\left(\frac{\mu_1 - \mu_2}{\sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}}\right) = \Phi\left(\frac{-0,0832 - 0,3361}{\sqrt{0,7475^2 + 0,7621^2}}\right) = \Phi(-0,3927) = 0,3472$$

Este valor se asocia con el AUC de la Curva de Probabilidad Conjunta calculada a partir de la ECD y SSD generadas (Figura 14.12.).

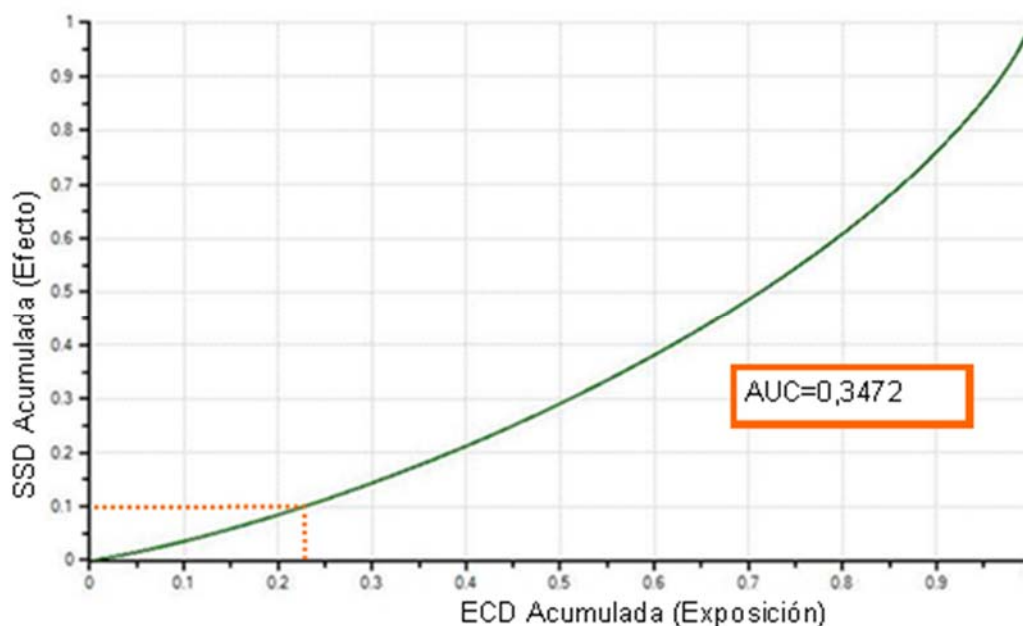


Figura 14.12: Curva de Probabilidad Conjunta

Considerando escenarios de exposición agudos generados principalmente por eventos post-aplicación/escorrentía existe riesgo alto para los invertebrados acuáticos en estos cuerpos de aguas superficiales dado que el AUC calculado (Riesgo Ecológico $\approx 0,35$) es mayor a 0.33 o 33%. Según la Curvad de Probabilidad Conjunta en al menos el 50% de las veces que se generen estos escenarios de exposición el 30% de las especies (PAF aprox. 0,3) de invertebrados se verán afectada negativamente. Bajo estas condiciones, 10% (PAF de 0,1) de las especies de invertebrados serán afectadas y esta proporción de especies podría afectarse en el 77% ($0.77=1-0,23$) de los actuales escenarios de exposición.

Dentro de las limitaciones y alcances de las conclusiones de la presente evaluación hay que considerar que solo se está teniendo en cuenta el efecto directo sobre el ensamble de invertebrados en un escenario de exposición aguda. Existen incertidumbres asociadas con la representatividad de los perfiles de exposición (reparto y vida media del clorpirifos en función de características de los cuerpos de agua) y perfiles de efectos (efectos subletales, representatividad, respuesta laboratorio-campo). Habría que considerar el efecto directo del clorpirifós sobre vertebrados acuáticos y el efecto indirecto sobre estos por las relaciones tróficas al disminuir drásticamente los invertebrados. Otro punto que no contempla la presente evaluación es la tasa reproductiva de muchos invertebrados que si las condiciones son favorables podría generar una recuperación rápida de las poblaciones naturales.

Si bien el escenario de exposición fue generado con concentraciones medidas en los cuerpos de agua no se está considerando la biodisponibilidad del clorpirifós en la columna de agua, lo que podría estar sobreestimando el riesgo. No se incorporó al sedimento como vía de exposición a los organismos que puede tener una incidencia importante sobre organismos bentónicos.

En la presente evaluación se utilizaron datos obtenidos de bioensayos de laboratorio (caracterización de efectos) y concentraciones determinadas en los cuerpos de agua (caracterización

de la exposición) para generar estimaciones del riesgo. Existen otras líneas de evidencia que no fueron contempladas, como evaluaciones a nivel de mesocosmos, experimentos en condiciones de semicampo y evaluaciones “*in situ*” de los efectos biológicos; muchas en escenarios regionales con resultados consistentes con lo obtenido.

En línea con la evidencia presentada, el nivel de afectación de invertebrados acuáticos sería de mediano a alto en la mayoría de los escenarios de exposición post-aplicación/escorrentía constituyendo un riesgo alto para las comunidades acuáticas.

Bibliografía

- Demetrio (2012) *Estudio de efectos biológicos de plaguicidas utilizados en cultivos de soja RR y evaluación de impactos adversos en ambientes acuáticos de agroecosistemas de la región pampeana* Tesis doctoral, Recuperada de: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/18139>
- ECOTOX (ECOTOXicology) Release 4.0, USEPA. Recuperado de: <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>
- Giesy & Solomon (2014) *Ecological Risk Assessment for Chlorpyrifos in Terrestrial and Aquatic Systems in the United States*. Springer Nature. 265 p
- Hose & Van den Brink (2004). Confirming the Species-Sensitivity Distribution Concept for Endosulfan Using Laboratory, Mesocosm, and Field Data. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(4), 511-520.
- Maltby, Blake, Brock & Van den Brink (2005). Insecticide species sensitivity distributions: importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(2), 379-388.
- Posthuma & Traas (2002). *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*, Lewis Publishers, Boca Raton, 616 p.
- Solomon & Sibley, (2002). New concepts in ecological risk assessment: where do we go from here? *Marine Pollution Bulletin*, 44(4), 279-285.
- Solomon, Giesy & Jones (2000). Probabilistic risk assessment of agrochemicals in the environment. *Crop Protection*, 19(8-10), 649-655.
- Suter GW II (2007) *Ecological risk assessment*, 2nd ed. CRC-Lewis Press, Boca Raton. 643 p
- Suter GW II (2008) Ecological risk assessment in the United States Environmental Protection Agency: a historical overview. *Integr Environ Assess Manag* 4:285–289
- USEPA (1992). *Hazard Ranking System Guidance Manual*, Washington. EPA 540-R-92-026. Recuperado de: <https://semspub.epa.gov/work/HQ/189159.pdf>
- USEPA (1998). *Guidelines for Ecological Risk Assessment*, Washington. EPA 630-R-95-002, Recuperado de: https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-11/documents/eco_risk_assessment1998.pdf
- USEPA (2001) *Risk assessment guidance for superfund: Volume III – Part A, process for conducting probabilistic risk assessment*. Washington, DC EPA 540-R-02-002 Recuperado de: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/rags3adt_complete.pdf

Los Autores

Coordinador

Carriquiriborde Pedro

Dr. en Ciencias Naturales y Lic. en Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de la Plata (UNLP). Profesor Adjunto de las Cátedras de Biología y Ecotoxicología y Evaluación de Riesgo de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP). Investigador Independiente del CONICET y Docente Investigador Categoría II del Ministerio de Educación de la Nación. Autor de 38 publicaciones científicas, 3 capítulos de libros, 1 norma de calidad IRAM y 2 publicaciones de divulgación en temas de Toxicología de Peces, Ecotoxicología, Contaminación de Ambientes Acuáticos y Evaluación de Riesgo Ecológico. Director y codirector de tesis de grado y postgrado. Exmiembro del Consejo Directivo Mundial de SETAC y Expresidente de la Rama Latinoamericana de la Sociedad. Asesor de diferentes instituciones públicas y privadas en temas de contaminación ambiental.

Autores

Amé María Valeria

Bioquímica y Doctora en Ciencias Químicas, egresada de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC. Actualmente se desempeña como Investigadora Independiente del CONICET y como Profesora Asociada de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC. Forma recursos humanos y dirige subsidios nacionales e internacionales para llevar adelante su trabajo de investigación siendo coautora de numerosos trabajos científicos en revistas científicas de alto impacto en el área y de capítulos de libro. Su línea actual de investigación incluye la evaluación integrada de ecosistemas acuáticos buscando identificar marcadores químicos de contaminación antrópica y evaluar su efecto sobre la biota acuática nativa.

Anguiano Olga Liliana

Profesora en Química de la Universidad Nacional del Comahue (UNCo) y tiene una Maestría en Ciencias Químicas con orientación en Química Biológica de la UNCo. Es Profesora Adjunta en el área de Química General e Inorgánica de la Facultad de Ingeniería de la UNCo e investigadora

Categoría II del programa de incentivos. Autora de artículos de investigación en el tema de toxicología de plaguicidas en organismos acuáticos e insectos en revistas especializadas internacionales, nacionales y de presentaciones en congresos. Ha realizado diversas actividades de Extensión Universitaria y ha diseñado y elaborado afiches sobre plaguicidas. Ha sido coautora de 3 libros de divulgación y de un libro de texto sobre este tema, de distribución gratuita. Ha participado en la formación de recursos humanos en toxicología dirigiendo y codirigiendo tesis de grado y de maestrías. Miembro de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC).

Cazenave Jimena

Licenciada en Biodiversidad (UNL) y Doctora en Ciencias Biológicas (UNC). Se desempeña como investigadora Independiente del CONICET y docente de la Facultad de Humanidades y Ciencias (UNL). Su principal línea de investigación incluye el uso de biomarcadores en peces como herramientas para el monitoreo ambiental. Sus trabajos han sido publicados en reconocidas revistas internacionales dentro del área de las ciencias ambientales. En el último tiempo ha consolidado la formación de recursos humanos y la interacción con diferentes grupos de investigación del país y el exterior. Dirige proyectos de investigación subsidiados y realiza numerosas actividades de evaluación y gestión.

Demetrio Pablo Martín

Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de la Plata (FCE-UNLP). Especialista en Gestión Ambiental del Instituto Tecnológico de Buenos Aires (ITBA). Licenciado en Biología (Orientación Ecología) de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP. Docente de cursos de posgrado en Ecotoxicología y Estadística aplicada a las Ciencias Ambientales en la UNLP y otras universidades del país. Jefe de Trabajos Prácticos de Introducción a las Ciencias Ambientales y de Ecotoxicología y Evaluación de Riesgos de la FCE-UNLP. Investigador Adjunto del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) con lugar de trabajo en el Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CONICET- UNLP). Director de proyectos de investigación en su disciplina y autor de diversas publicaciones internacionales en la temática.

Eissa Bettina Lorena

Doctora de la Universidad de Buenos Aires, en Ciencias Biológicas (2009), con la Tesis “Biomarcadores comportamentales, fisiológicos y morfológicos de exposición al Cadmio en peces pampeanos”. Becaria de Perfeccionamiento de la CIC-Prov. de Bs. As. y Doctoral (tipo II) del CONICET. Integrante del Programa de Ecofisiología Aplicada que forma parte del Inst. Nac. de Ecología y Desarrollo Sustentable (INEDES). JTP ordinario en Fisiología Animal, Fisiología General y Química I de la Licenciatura y el Profesorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Luján. Es docente del curso de postgrado “Monitoreo de la contaminación de ríos” que se dicta en la UNLu. Es autora de 15 publicaciones en revistas científicas, 5 capítulos en libros y 60 presentaciones en congresos nacionales e internacionales. Investiga las respuestas de biomarcadores comportamentales y fisiológicos en peces por exposición a tóxicos.

Ferrari Ana

Licenciada en Biología de la Universidad Nacional de La Plata y doctora en Biología de la Universidad Nacional del Comahue (UNCo). Investigadora Adjunta del CONICET y Profesora Adjunta en la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNCo e investigadora Categoría II del programa de Incentivos. Autora de artículos de investigación en el tema de toxicología de plaguicidas en organismos acuáticos en revistas especializadas internacionales y nacionales, así como también capítulos de libros. Ha realizado diversas actividades de extensión universitaria en el tema de plaguicidas. Ha participado como autora de libros de divulgación y de un libro de texto sobre este tema, de distribución gratuita. Ha participado en la formación de recursos humanos especializados en toxicología dirigiendo y codirigiendo tesis de doctorado, maestría y grado. Miembro de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC).

Gagneten, Ana María

Profesora en Ciencias Biológicas, Magister en Ciencias Biológicas por la Universidad de Chile y Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad Nacional del Litoral. Prof. Titular Cat 1 en las asignaturas Diversidad Animal 1 y Ecofisiología Animal y en la Maestría en Gestión Ambiental (UNL). Estudios ecotoxicológicos en sistemas acuáticos continentales a escala de laboratorio, mesocosmos y campo. Análisis de efectos de agroquímicos, metales y contaminantes emergentes en organismos no blanco mediante bioindicadores y biomarcadores. Responsable del Laboratorio de Ecotoxicología de la Facultad de Humanidades y Ciencias (UNL).

Laborde Milagros R R

Licenciada en Biología (Orientación en Zoología), egresada de la FCNyM (UNLP). Becaria Doctoral de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT). Doctorando en Ciencias Naturales de la FCNyM (UNLP). Su trabajo de investigación se encuentra dentro del campo de la sanidad ambiental, con especialidad en Genética Toxicológica investigando los efectos genotóxicos y citotóxicos de diferentes formulaciones comerciales de agroquímicos con especial interés en micro y nano-formulaciones utilizando cultivos de células como modelo de estudio.

Larramendy Marcelo L

Ph.D., Profesor de Biología Celular Molecular en la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (Universidad Nacional de La Plata, Argentina) e Investigador Superior del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) de Argentina. Autor de más de 480 contribuciones, incluidas publicaciones científicas, comunicaciones de investigación y conferencias en todo el mundo. Destinatario de varios premios nacionales e internacionales. Es profesor titular de los cursos internacionales A. Hollaender organizados por el IAEMS y ex científico invitado en los NIH (EE. UU.) y de la Universidad de Helsinki (Finlandia). Experto en Genética Toxicológica y árbitro de más de 40 revistas científicas internacionales. Miembro del Panel Internacional de Expertos de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, OMS, Lyon, Francia) en 2015 para la evaluación de los plaguicidas DDT, 2,4-D y lindano.

Fabiana Laura Lo Nostro

Es doctora en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Investigadora Principal del CONICET y Profesora en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Se especializó en fisiología de la reproducción de peces y actualmente dirige el grupo de “Ecotoxicología Acuática”, en el Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada (IBBEA, CONICET-UBA). Tiene más de 28 años como docente de grado y postgrado dentro y fuera del país, y se desempeña como Profesora en la carrera de “Especialización en Pesca y Producción Acuicola” (FVET, UBA). Ex presidente de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC), capítulo argentino y ganadora del premio “Global Partner Capacity Building Award” otorgado por la SETAC Mundial. Tiene más de 60 trabajos publicados en revistas internacionales y más de 150 presentaciones a congresos nacionales e internacionales, algunos de ellos premiados. Su actual área de investigación es el impacto de contaminantes antropogénicos de preocupación emergente en peces teleósteos y cartilaginosos de agua dulce y marina, especialmente agroquímicos, fármacos de uso humano y veterinario, efluentes cloacales y plastificantes.

Menone Mirta Luján

Licenciada en Ciencias Biológicas y Doctora en Ciencias Biológicas, egresada de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP). Realizó un postdoctorado en el IGB- Berlín (Alemania) como becaria de la Fundación Alexander von Humboldt. Es docente de grado y postgrado en la UNMDP desde hace más de 20 años y actualmente se desempeña como Investigadora Independiente del CONICET. Trabaja en ecotoxicología de ecosistemas acuáticos, estudiando biomarcadores bioquímicos (ej. enzimas detoxificantes y antioxidantes) y de genotoxicidad (a nivel citogenético y molecular) principalmente en macrófitas acuáticas y peces. Formadora de recursos humanos (5 tesis de grado y 6 tesis de doctorado) y directora de numerosos proyectos nacionales e internacionales.

Miglioranza Karina Silvia Beatriz

Licenciada y Doctora en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Mar del Plata. Se desempeña como Investigadora Principal del CONICET. Es docente de grado y postgrado de la FCEyN-UNMDP. Dirige el Grupo Ecotoxicología y Contaminación Ambiental (IIMyC-CONICET, UNMDP). Es autora de más de 110 trabajos científicos en su especialidad. Ha sido Miembro del Consejo Mundial de la SETAC, Presidente de SETAC Latina, y actualmente Presidente de SETAC Capítulo Argentino. Acreedora del premio “Global Partner Capacity Building Award” (SETAC). Miembro de la Subcomisión Crop Protection Chemistry (IUPAC) y Miembro Experto de UNEP. Trabaja en contaminación por compuestos orgánicos persistentes, plaguicidas de uso actual y contaminantes emergentes en cuencas. Ha formado recursos humanos de grado y Postgrado, ha dirigido proyectos de Investigación nacionales e internacionales.

Montserrat José María

Licenciado en Ciencias Biológicas con diploma de honor (1988) y Master en Biometría (1993) de la Universidad de Buenos Aires. Doctor en Oceanografía Biológica en la Universidad Federal do Rio Grande - FURG, Brasil (1997). Post-doc en Metabolómica en el National Institute of Standards and Technology (NIST) en Charleston, Estados Unidos (2013). Autor de 206 artículos en revistas internacionales especializadas en las áreas de Acuicultura, Estrés Oxidativo en Organismos Acuáticos, Toxicología Acuática y Nanotoxicología. Profesor Asociado en la Universidad Federal do Rio Grande - FURG e investigador del CNPq. Profesor permanente de los programas de post-grado de Acuicultura y Ciencias Fisiológicas en la FURG. Miembro del cuerpo editorial de las revistas Marine Life Science & Technology y Chemistry and Ecology. Coordinador del Laboratorio NanoSul da Universidade Federal do Rio Grande - FURG perteneciente a la red SisNano de Brasil.

Ossana Natalia Alejandra

Doctora de la Universidad de Buenos Aires, área Ciencias Biológicas desde el 2012, y su Tesis fue “Biomarcadores de contaminación acuática: estudios en los ríos Luján y Reconquista”. Ha obtenido Becas de Estudio de la CIC-Prov. de Bs. As. y Doctorales y Postdoctorales del CONICET. En la actualidad es Co-Directora del Programa de Ecofisiología Aplicada (PRODEA). Investigadora Adjunta del CONICET y JTP ordinario en Fisiología Animal y Fisiología General para la Licenciatura y el Profesorado en Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional de Luján. Autora de 19 publicaciones en revistas científicas y de 60 presentaciones en congresos nacionales e internacionales desde el 2004 a la actualidad. Investiga las respuestas de biomarcadores comportamentales, bioquímicos, fisiológicos y de genotoxicidad en peces y anfibios.

Peluso María Leticia

Investigadora Adjunta del CONICET y docente de la Facultad de Cs. Naturales y Museo de la UNLP y de la Carrera de Gestión Ambiental de la UnSADA. Realizó su doctorado en ecotoxicología y calidad de sedimentos de cuerpos de agua dulce de la cuenca del Plata. En la actualidad se desempeña como investigadora en el Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIM-UNLP-CONICET). Presenta más de diez publicaciones en revistas científicas de impacto y más de cincuenta presentaciones en reuniones científicas nacionales e internacionales, además participa en el asesoramiento técnico-científico para la elaboración de normativas y protocolos de gestión de sedimentos contaminados y provenientes de dragado. En relación a la formación de recursos humanos, se desempeñó como directora y codirectora en numerosas tesis de grado y tesis de doctorado de la Fac. de Cs. Exactas de la UNLP.

Regaldo Luciana

Licenciada en Biodiversidad, Profesora de Biología y Doctora en Ciencias Biológicas, graduada en Universidad Nacional del Litoral (UNL). Profesora Adjunta en las cátedras Ecotoxicología y Gestión Ambiental de la Licenciatura en Biodiversidad y el Profesorado de Biología de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la UNL. Docente de la Maestría en Gestión Ambiental que se

dicta en la Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas de la UNL. Investigadora Asistente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), con lugar de trabajo en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la UNL.

Rimodi Federico

Licenciado en Biología (Orientación: Ecología) Facultad de Ciencias Naturales y Museo Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP). Investigador adjunto de CONICET. Participó como asesor técnico contratado en el Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible. Docente de la Cátedra de Biología de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP). Docente de más de 10 cursos de postgrado. Investigador responsable de un proyecto de Investigación de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Miembro del Consejo Directivo del Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIM). Autor de 1 capítulo de libro, 13 publicaciones en revistas internacionales y 46 presentaciones en reuniones científicas nacionales e internacionales. Formación de recursos humanos (Tesis de grado y maestría).

Ruiz de Arcaute Celeste

Licenciada en Biología (Orientación en Ecología) y Doctora en Ciencias Naturales en la FCNyM (UNLP). Es Ayudante de Primera en la Cátedra de Genética y en la Cátedra de Citología de la FCNyM (UNLP). Su trabajo de investigación se encuentra dentro del campo de la sanidad ambiental, con especialidad en Ecotoxicología y Genética Toxicológica. Actualmente es Becaria Posdoctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) con investigando sobre la problemática del uso de agroquímicos empleados en el Cinturón Hortícola Platense y analizando efectos genotóxicos y mecanismos de daño oxidativo en el pez nativo *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae).

Soloneski Sonia

Licenciada en Biología y Doctora en Ciencias Naturales, FCNyM (UNLP). Investigadora Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Jefa de Trabajos Prácticos, Cátedra de Citología, FCNyM (UNLP). Miembro de la Asociación Latinoamericana de Mutagénesis, Teratogénesis y Carcinogénesis Ambiental (ALAMCTA), la Sociedad Argentina de Toxicología (ATA), la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC) y la Sociedad Argentina de Biología (SAB). Autora de más de 350 contribuciones científicas, incluidas publicaciones en revistas internacionales, comunicaciones en congresos y conferencias nacionales e internacionales. Es una referente internacional en temas vinculados al campo de la Genética Toxicológica, Mutagénesis y Ecotoxicología. Docente de numerosos cursos de posgrado en Genética Toxicológica, Contaminación Ambiental y Ecotoxicología.

Gustavo Manuel Somoza

Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Investigador Superior del CONICET y Profesor Asociado de la Universidad Nacional de San Martín (UNSAM). Actualmente es director del Instituto Tecnológico de Chascomús (CONICET-UNSAM) en donde también dirige el Laboratorio de Ictiofisiología y Acuicultura. Ex presidente de la Sociedad Argentina de Biología, ex presidente de la Sección Latinoamericana de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC) y ex miembro del Consejo Mundial de SETAC. Tiene más de 140 trabajos publicados en revistas internacionales con referato y más de 300 presentaciones a congresos nacionales e internacionales. Sus líneas de trabajo abarcan temas como neuroendocrinología de peces teleósteos y cartilagosos, determinación y diferenciación sexual y perturbación endócrina.

Principios de ecotoxicología / Valeria Amé ... [et al.] ; coordinación general de Pedro Carriquiriborde. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata ; EDULP, 2021.

Libro digital, PDF - (Libros de cátedra)

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-950-34-1987-8

1. Medio Ambiente. I. Amé, Valeria. II. Carriquiriborde, Pedro, coord.
CDD 577.07

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata
48 N.º 551-599 / La Plata B1900AMX / Buenos Aires, Argentina
+54 221 644 7150
edulp.editorial@gmail.com
www.editorial.unlp.edu.ar

EduLP integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2021
ISBN 978-950-34-1987-8
© 2021 - EduLP