

# 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.).

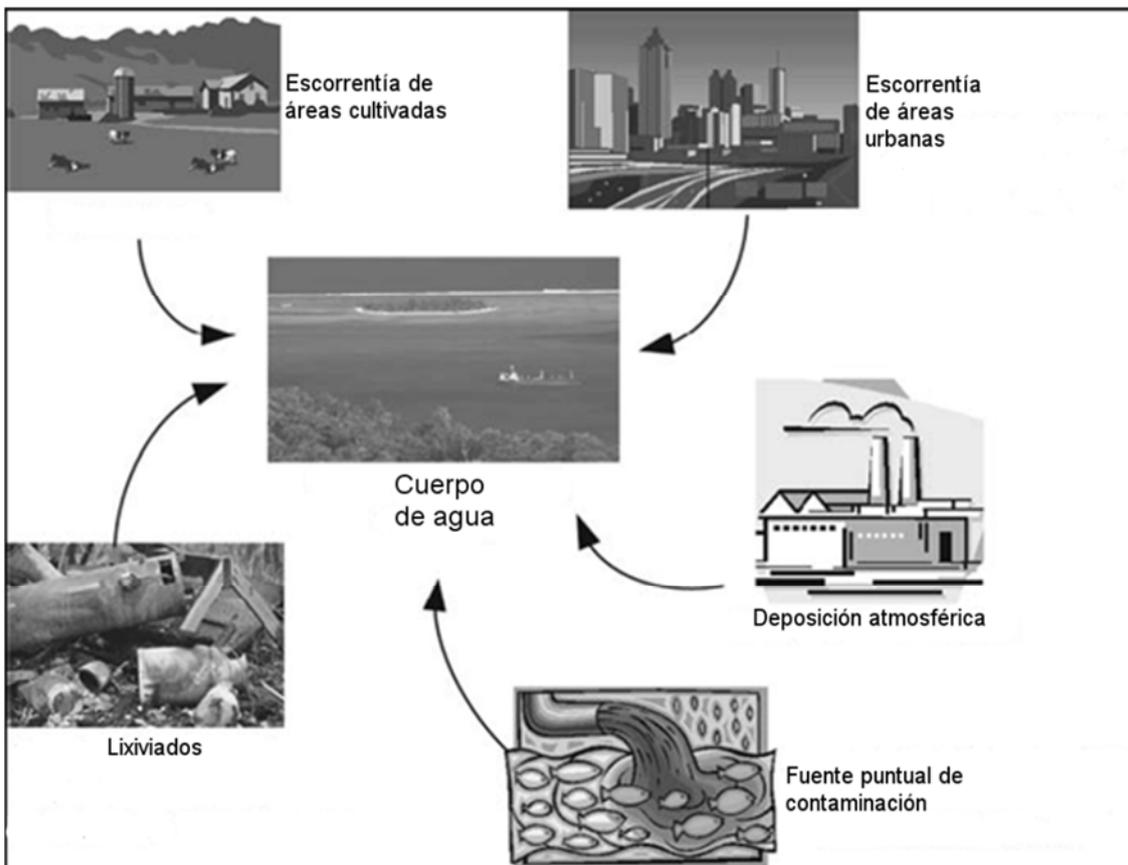


Figura 12.1: Esquema general de las fuentes de contaminación sobre ambientes acuáticos

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.

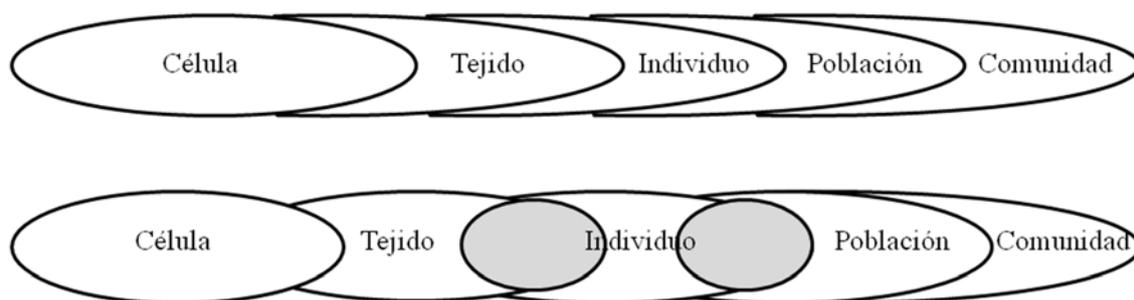


Figura 12.2: Esquema conceptual de la relación de los efectos tóxicos en diferentes niveles de organización biológica. Las zonas grises representan las áreas de incertidumbre.

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 (cuantales) 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 cuantil. 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 *Hyaella curvispina* expuestos a zinc y cromo llevados a cabo por dos laboratorios diferentes.

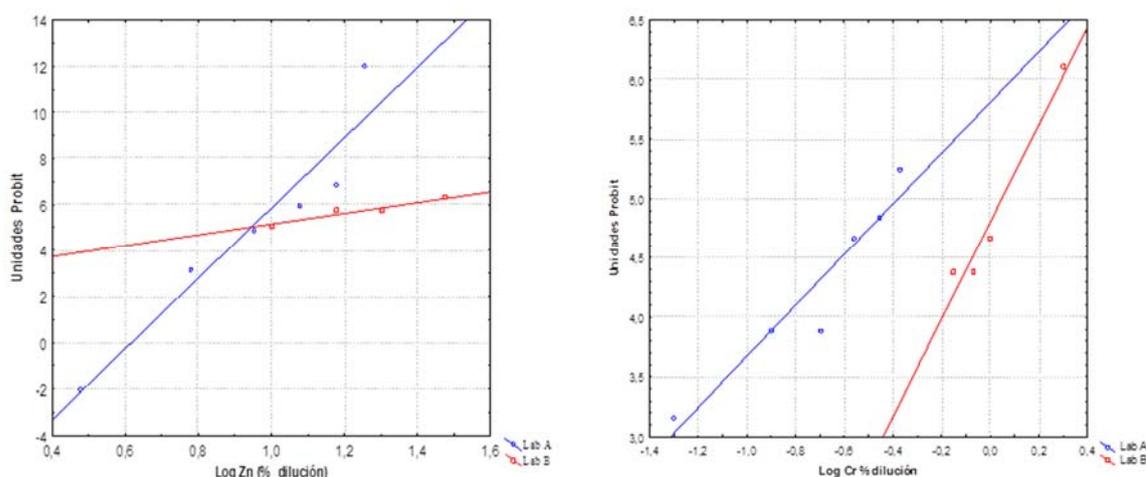


Figura 12.3: Comparación de curvas C-R entre los ensayos en los laboratorios A y B. a: curvas C-R para cromo; b: curvas C-R para zinc. Las líneas punteadas indican la estimación de la concentración a partir del 50% de mortalidad (5 unidades Probit), para las curvas estimadas

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 los 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 mono-específicas, 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 squalirostris* entre otras. Entre los invertebrados podemos mencionar el anfibio 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 Muysen y Jensen (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.).

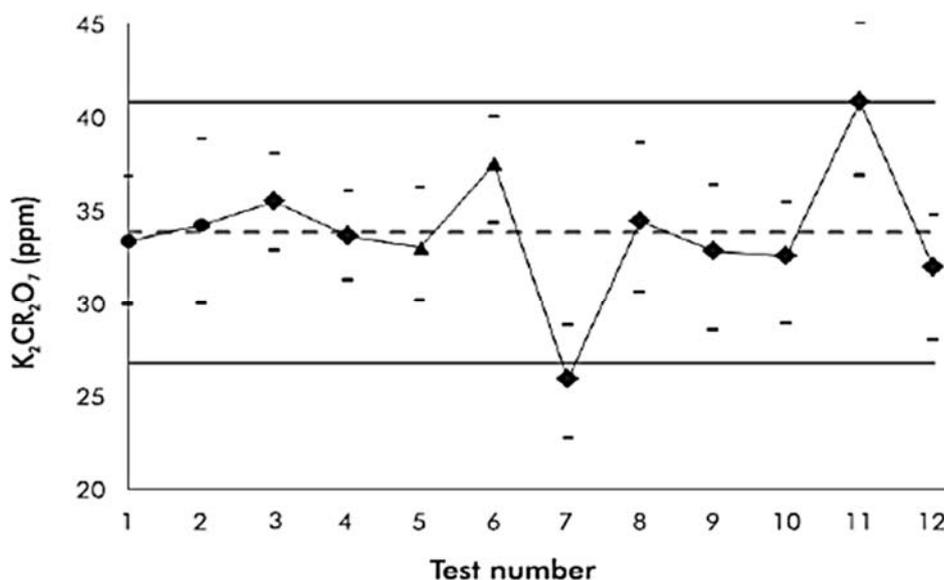


Figura 12.4: Ejemplo de carta control donde se grafican las CL50 (dicromato de potasio en ppm) en ensayos consecutivos a lo largo del tiempo (número de pruebas).

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

(K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) 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 ciprínidos 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 *Palaemonetes 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.

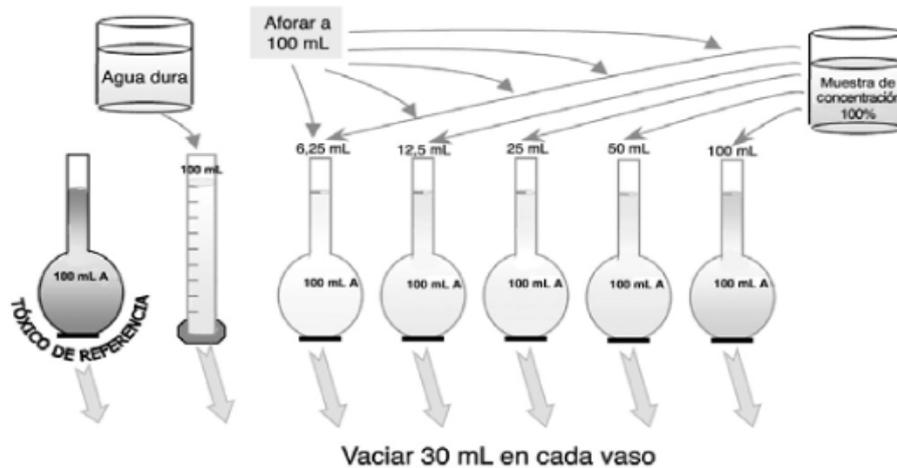
El género *Daphnia* pertenece al orden Cladóceras dentro de la clase Crustácea, y las especies *D. magna*, *D. pulex* y *D. similis*, son muy utilizadas en pruebas de toxicidad por lo que existe numerosa información acerca de técnicas de cultivo, requisitos en cuanto a iluminación, temperatura y nutrientes. 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 de clorinada 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

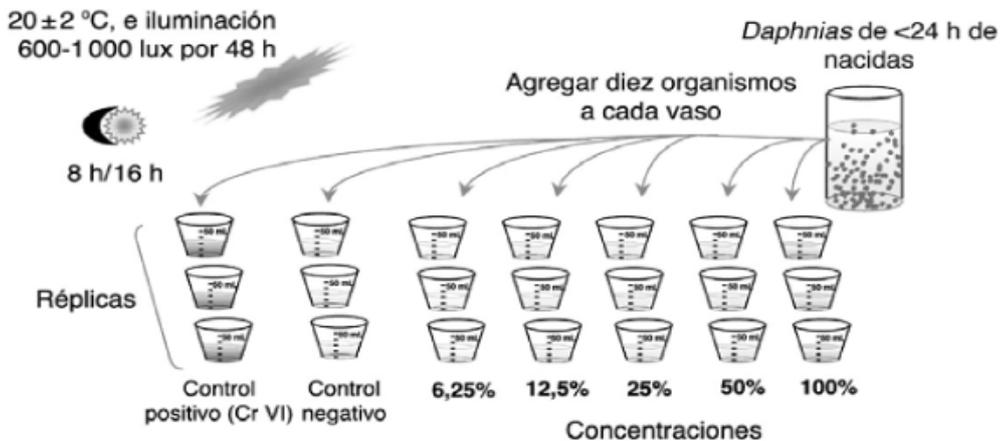


Figura 12.6. Procedimiento general de ensayo de toxicidad con *D. magna*

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**

<b>Condiciones</b>	
Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	20± 2 °C
Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
Intensidad luminosa	10-20 ±E /m2/ 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  $\mu\text{m}$ ) 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***

<b>Condiciones</b>	
Temperatura	21 ± 1 °C
Fotoperíodo	16:8 horas luz/oscuridad
Renovación	Con renovación parcial (60 %) cada 24 h
Recipientes	Plásticos de 500 cm <sup>3</sup> 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. & Féraud, 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 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- $\delta$ -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 radiculares 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 O<sub>2</sub>/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.

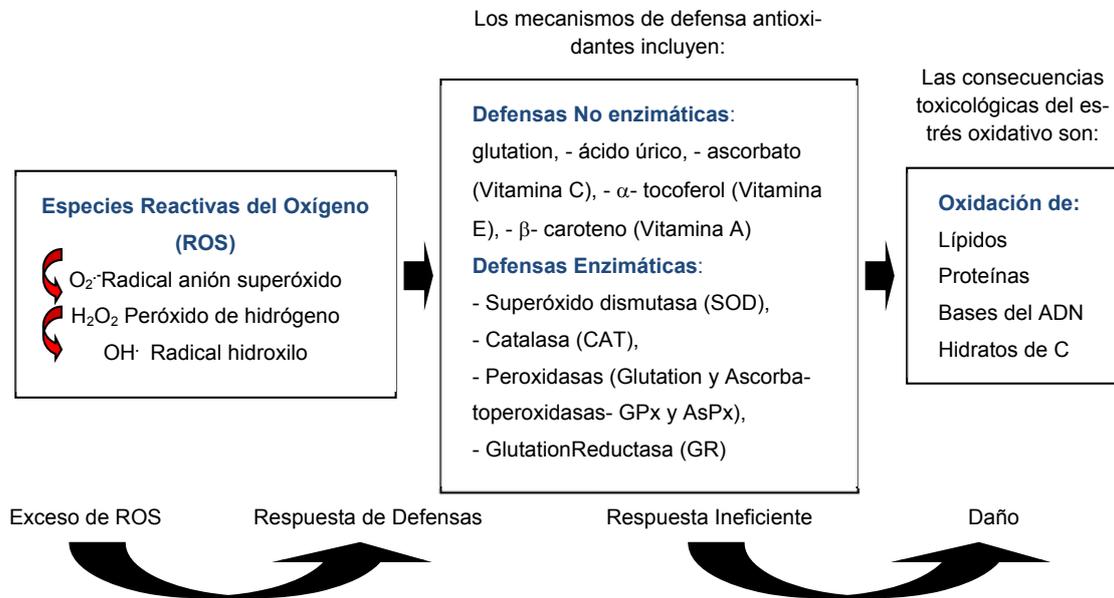


Figura 13.1: Diagrama del efecto de estrés oxidativo: especies reactivas del oxígeno, defensas celulares y sus consecuencias.

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; Barchetta 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 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 pallidosa* para detectar mutaciones génicas, el ensayo de aberraciones cromosómicas en ápices de raíz en *Vicia faba* y el de micronúcleos (MN) en *T. pallidosa*. 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 cladóceros *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.

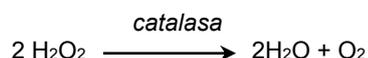
Si bien queda mucho trabajo por delante para evaluar e interpretar las respuestas de los biomarcadores y desarrollar procedimientos de control de calidad aceptables, los esfuerzos para incorporarlos en programas de monitoreo de rutina seguramente serán beneficiosos.

## 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> en la cubeta dada la alta procesividad de la enzima.

#### Determinación de la actividad enzimática:

	Blanco ( $\mu\text{L}$ )	Muestra ( $\mu\text{L}$ )
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8.0	50	50
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (12 $\mu\text{M}$ )	-	900
H <sub>2</sub> O	930	30
Incubar a 37°C por 10 min		
Muestra (extracto enzimático)	20	20

#### Comentarios y cálculos:

La velocidad de descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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  $\epsilon = 43.6 \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$  y se expresa como cantidad de enzima que degrada 1 $\mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/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 indifferent 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 *Hyallolella 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 Suquía River. *Ecological Indicators*, 48, 706-720.
- Roméo, 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.