

Libros de **Cátedra**

# Principios de Ecotoxicología

Pedro Carriquiriborde (coordinador)

FACULTAD DE  
CIENCIAS EXACTAS

**e**  
exactas

  
EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

# PRINCIPIOS DE ECOTOXICOLOGÍA

Pedro Carriquiriborde  
(coordinador)

Facultad de Ciencias Exactas



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

Edulp  
EDITORIAL DE LA UNLP

# Agradecimientos

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

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

RACHEL LOUISE CARSON, El Sentido del Asombro

# Índice

**Prefacio** \_\_\_\_\_ 8

## **Capítulo 1**

Introducción \_\_\_\_\_ 10

*Dr. Pedro Carriquiriborde*

## **PRIMERA PARTE**

### **Los contaminantes en el ambiente y su acumulación en la biota**

## **Capítulo 2**

Principales familias de contaminantes, fuentes, distribución y destino ambiental \_\_\_\_\_ 27

*Dra. Karina Miglioranza*

## **Capítulo 3**

Biodisponibilidad, biotransformación, bioacumulación y biomagnificación  
de los contaminantes \_\_\_\_\_ 62

*Dr. Pedro Carriquiriborde*

## **SEGUNDA PARTE**

### **Efecto de los contaminantes sobre los organismos**

## **Capítulo 4**

Bases sobre los efectos tóxicos inducidos por los contaminantes \_\_\_\_\_ 94

*Dr. Pedro Carriquiriborde*

## **Capítulo 5**

Estrés Oxidativo \_\_\_\_\_ 116

*Dr. José María Monserrat*

## **Capítulo 6**

Neurotoxicidad \_\_\_\_\_ 126

*Dra. Olga Anguiano; Dra. Ana Ferrari*

## **Capítulo 7**

Genotoxicidad y carcinogénesis \_\_\_\_\_ 148

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

## **Capítulo 8**

Disrupción Endócrina \_\_\_\_\_ 184

*Dr. Gustavo Somoza, Dra. Fabiana Lo Nostro*

## **Capítulo 9**

Alteración del Comportamiento \_\_\_\_\_ 191

*Bettina Eissa y Natalia Ossana*

## **TERCERA PARTE**

### **Respuestas a nivel de los ecosistemas**

## **Capítulo 10**

Efectos de los contaminantes sobre poblaciones \_\_\_\_\_ 209

*Dr. Federico Rimoldi*

## **Capítulo 11**

Efectos sobre las comunidades biológicas \_\_\_\_\_ 232

*Dra. Ana María Gagneten, Dra. Luciana Regaldo*

## **CUARTA PARTE**

### **Herramientas de la Ecotoxicología**

## **Capítulo 12**

Bioensayos de toxicidad \_\_\_\_\_ 268

*Dra. Leticia Peluso*

## **Capítulo 13**

Biomarcadores de Contaminación \_\_\_\_\_ 291

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

**Capítulo 14**

Evaluación de Riesgo Ecotoxicológica \_\_\_\_\_ 309

*Dr. Pablo Demetrio*

**Los Autores** \_\_\_\_\_ 336

# 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.

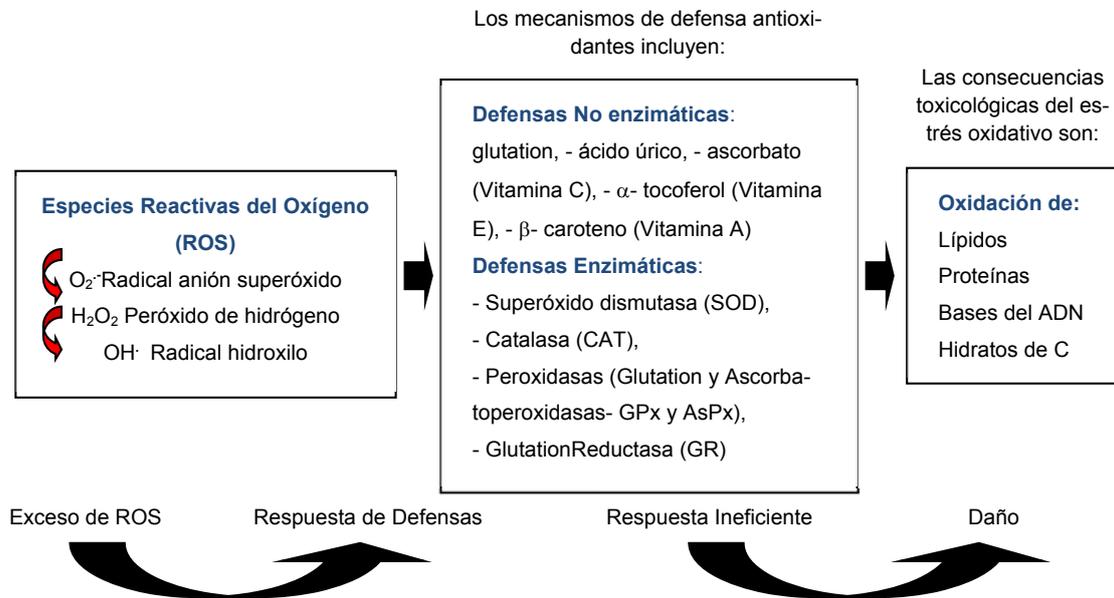


Figura 13.1: Diagrama del efecto de estrés oxidativo: especies reactivas del oxígeno, defensas celulares y sus consecuencias.

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 ( $H_2O_2$ ), una de las ROS (Menone et al., 2008). En la misma especie este efecto se ha demostrado por exposición a azoxystrobina, un fungicida estrobilurínico muy utilizado hoy día en Argentina, cuyo mecanismo de acción involucra el desacople del sistema de transporte de electrones mitocondrial en hongos, pero que también es capaz de generar daño oxidativo evidenciado por la inhibición de las enzimas CAT y guaiacol peroxidasa (POD) y el incremento concomitante en los niveles de MDA (Garanzini et al., 2015; 2019). Así, concentraciones de relevancia ambiental en exposiciones agudas, que reflejarían pulsos de agroquímicos posibles de detectarse en el ambiente luego de eventos de escorrentía desde campos de cultivo, fueron capaces de originar estrés oxidativo en especies nativas que habitan ecosistemas dulceacuícolas de Argentina y los parámetros seleccionados constituyeron biomarcadores de dicho efecto.

Estos biomarcadores son los más utilizados, principalmente debido a su sensibilidad alta así como por la variedad de contaminantes capaces de generar el efecto de estrés oxidativo. En el Anexo I se detalla la técnica para la medición de la actividad de la enzima catalasa.

### **Parámetros neuromusculares**

Para el normal funcionamiento de los sistemas sensoriales y neuromusculares, en casi todos los taxa del reino animal, el neurotransmisor acetilcolina es vital, dado que es utilizado para transmitir impulsos nerviosos a través de la sinapsis. La enzima acetilcolinesterasa (AChE) tiene una función clave en la regulación o desactivación de esta transmisión nerviosa mediante la hidrólisis de la acetilcolina. Es por ello que cualquier sustancia que inhibe su actividad catalítica determinará que la acetilcolina se acumule en las terminaciones nerviosas y permanezca por más tiempo estimulando sus receptores postsinápticos, lo cual puede provocar temblores, disfunción motora y la muerte del animal. Los peces, por ejemplo, mueren cuando la actividad de AChE disminuye más del 70-80%.

Los plaguicidas organofosforados (OPs) y carbamatos inhiben la actividad de AChE. Dicha inhibición ha sido, por lo tanto, utilizada para evaluar la naturaleza y extensión de la exposición de la vida silvestre a este tipo de compuestos. La medición de AChE es más sencilla, rápida y menos costosa que los análisis químicos de OPs y carbamatos, los cuales son metabolizados y eliminados rápidamente. Por el contrario, la inhibición de AChE puede persistir más tiempo, lo cual serviría para demostrar la exposición previa de los organismos a estos compuestos. Por

ejemplo, en monitoreos en el río Reconquista se observó inhibición de AChE en el cerebro del pez *Cnesterodon decemmaculatus* recolectados en sitios donde no se encontró en agua cantidades detectables de insecticidas OPs (de la Torre et al., 2005).

A pesar de la utilidad como un biomarcador específico, en los últimos años, se ha generado evidencia de que otros tóxicos (ej., otros plaguicidas, detergentes, metales, toxinas de cianobacterias) exhiben actividad anticolinesterásica.

Otros posibles biomarcadores neuromusculares son las alteraciones que pueden generar determinados tóxicos sobre la estructura de las miofibrillas del músculo esquelético y su capacidad de contracción. Así, por ejemplo, se han detectado proteínas miofibrilares muy susceptibles al estrés oxidativo como indicadores de toxicidad del insecticida endosulfán (Crupkin et al., 2018).

### Genotoxicidad

Si bien en el presente libro hay un capítulo particularmente sobre estos efectos (ver Capítulo 7), aquí mencionaremos los más utilizados en bioindicadores vegetales, particularmente en macrofitas acuáticas. En 1984 el “International Program on Chemical Safety (IPCS)”, auspiciado por el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), inició un estudio colaborativo para evaluar el uso de bioensayos de corto plazo con plantas para la detección de sustancias potencialmente mutagénicas y carcinogénicas. Entre los modelos de bioensayos utilizados se encuentra el ensayo de pelos estaminales en *Tradescantia 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  de acuerdo con la siguiente reacción:



Esta enzima es particularmente abundante en los peroxisomas de los hepatocitos y su alta procesividad y fácil determinación la hace un biomarcador comúnmente en ecotoxicología para evaluar el estatus del sistema antioxidante.

#### Procedimiento:

Homogenización del tejido: La muestra de hígado o tejido a evaluar suele homogenizarse en solución tampón (fosfato o Tris-HCl) a pH 7,2 utilizando un mortero u homogeneizador de vidrio (tipo Potter- Elvehjem), rotor-estator (tipo Politrón o Ultra-Turrax) o de ultrasonido. En tejidos animales la relación tejido:solución tampón suele ser de 1:4. El procedimiento debe realizarse siempre manteniendo el frío en baño de hielo para evitar procesos degradativos. Para una mayor purificación de la enzima, el homogenato debe filtrarse a través de una gaza estéril y luego centrifugarse en una centrífuga de mesada refrigerada a la mayor potencia disponible (ej. 10.000 g por 20 min a 4 °C). La actividad de la catalasa será evaluada en el sobrenadante resultante. Por lo general requiere de una dilución posterior del homogenato (ej. 1:100) en la misma solución tampón para evitar la formación de burbujas de 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 *Hyallela 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.