

Recabarren-Villalón, T., A. C. Ronda y A. H. Arias. 2019. Uso de biomarcadores en la evaluación ambiental de ecosistemas marinos en América. *JAINA Costas y Mares ante el Cambio Climático* 1(2): 1-18. doi 10.26359/52462.0719



Uso de biomarcadores en la evaluación ambiental de ecosistemas marinos en América

Tatiana Recabarren-Villalón¹, Ana C. Ronda^{1,2} y Andrés H. Arias^{1,3}

¹Instituto Argentino de Oceanografía (IADO – CONICET/UNS),
Camino La Carrindanga km 7.5, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

²Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia,
Universidad Nacional del Sur,
Av Alem 1253, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

³Departamento de Química, Área III, Química Analítica,
Universidad Nacional del Sur, Av Alem 1253, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

* autor de correspondencia: tatiana.recabarrenv@gmail.com

doi 10.26359/52462.0719

Recibido 10/septiembre/2019. Aceptado 10/diciembre/2019

JAINA Costas y Mares ante el Cambio Climático

Coordinación editorial de este número: Edgar Mendoza Franco

Este es un artículo bajo licencia Creative Commons CC BY-NC-ND.



Resumen

El uso de biomarcadores en la evaluación de ambientes marinos ofrece una medida integrada de los efectos que los contaminantes causan sobre un determinado ecosistema. La siguiente revisión agrupa las investigaciones realizadas sobre el estudio de posibles biomarcadores en organismos marinos-costeros de América en su hábitat natural. La información adquirida para el continente – y a nivel mundial – señala la necesidad de continuar evaluando los cambios que los organismos experimentan, teniendo en cuenta las variables ambientales y los niveles de contaminantes que pueden encontrarse en un determinado ecosistema. Se ha sugerido la determinación de biomarcadores como una herramienta práctica para el manejo ambiental, pero su inclusión no ha sido universalmente aceptada aún, debido al número de preguntas sin resolver sobre su especificidad, sensibilidad, utilidad, reproducibilidad e interpretación. En el continente americano fueron utilizados múltiples biomarcadores en la evaluación ambiental marino, relacionados con contaminantes específicos o zonas de alto impacto antrópico. Los organismos más utilizados fueron peces y bivalvos; aunque también se han analizado en gran medida tortugas marinas. Gran parte de los autores integraron en sus trabajos biomarcadores de distintos grupos, clasificados en esta revisión como: biomarcadores biométricos (morfológicos e índices corporales), biomarcadores histológicos (a nivel de tejido), biomarcadores moleculares (genéticos) y biomarcadores bioquímicos y fisiológicos (ambos a nivel celular y molecular). Siguiendo esta clasificación, los biomarcadores más utilizados fueron los bioquímicos y los fisiológicos, debido a las grandes ventajas e información que éstos proveen. Es de suma importancia establecer valores y patrones de referencia para los biomarcadores analizados a fin de que puedan utilizarse como herramientas de diagnóstico que permitan evaluar de forma temprana e integrada los efectos perjudiciales de los contaminantes, antes de que un determinado ambiente se vea severamente afectado.

Palabras clave: biomarcadores, evaluación ambiental, América.

Abstract

The use of biomarkers in the assessment of the marine environmental status offers an integrated approach to the effects caused by diverse pollutants. This article compiles and analyzes the original research on the study of possible biomarkers in wild coastal-marine organisms from America. One of the outcomes of this review research is the need for a continuous evaluation of organisms in conjunction with the assessment of environmental variables and the levels of pollutants that may be found in any ecosystem. It is well stated that the use of biomarkers is a practical tool for the environmental management; however, some limitations apply and there are several questions in regards to specificity, sensibility, usability, replicability, and interpretation to be solved, yet. Along the American continent, multiple biomarkers have been used to evaluate specific pollutants or highly impacted zones at marine-coastal environments. The most commonly used organisms are fishes and bivalves and they have been also extensively used in marine turtles. In regards of the type of biomarkers, plenty of authors integrate biomarkers from different groups, sorted in this review as biometric biomarkers (morphologic and corporal indexes), histological biomarkers (for tissues), molecular biomarkers (genetic) and biochemical and physiological biomarkers (both at the cellular and molecular levels). Following this classification, the most used biomarkers were biochemical and physiological biomarkers, due to the great advantages and information that they provide. It is of utmost importance to set guidelines and referenced threshold values for each biomarker to allow the early environmental diagnosis and integrated evaluation of harmful pollutants effects.

Keywords: Biomarkers, environmental assessment, America.



Introducción

La calidad de los ambientes marinos puede estar comprometida por entradas significativas de contaminantes procedentes principalmente de la actividad humana. Para evaluar la contaminación en estos ecosistemas, se han monitoreado a través de estudios físico-químicos durante varias décadas, las especies y cantidades de las sustancias tóxicas tanto en sedimentos y columnas de agua como en organismos bioindicadores, como bivalvos, cangrejos y varias especies de peces (Douben, 2003; Potters, 2013). Los ecosistemas marinos del continente americano no son una excepción a ello, se ha reportado la existencia de contaminantes en sedimentos, agua (en la fase disuelta y particulada) e incluso en los organismos que lo habitan con concentraciones que van desde valores bajos a moderados y zonas puntuales con altos niveles de los mismos teniendo en cuenta los límites establecidos por regulaciones internacionales (Barra *et al.*, 2007; Pampanin y Sydnes, 2013). Si bien la identificación y la cuantificación de los diferentes contaminantes en el ambiente marino son necesarias para determinar la calidad del ecosistema, estos estudios no consideran los efectos ecotoxicológicos que ellos causan, siendo insuficientes para definir completamente las consecuencias que ocasionan (Chapman *et al.*, 2003).

Los biomarcadores son distintas alteraciones (biológicas, fisiológicas, metabólicas) que puede experimentar un determinado organismo o población en respuesta al estrés ambiental. Por ello se ha propuesto el monitoreo biológico o biomonitoreo a través del estudio de biomarcadores como una manera directa de probar las diferentes respuestas biológicas de los organismos a los contaminantes ambientales, y su implementación como complemento de la información obtenida a partir de los análisis químicos (Cheung *et al.*, 2001; Flammarión *et al.*, 2002). En los ecosistemas marinos también existen otros agentes estresantes como la falta o el exceso de nutrientes, hipoxia, turbidez, regímenes hidrológicos alterados, y sobrepoblación.

En este sentido los biomarcadores podrían ofrecer una medida integrada de los efectos que los organismos marinos experimentan a la exposición de los contaminantes y los cambios ambientales.

En general, para establecer a un biomarcador se han realizado muchos estudios a través de bioensayos, donde se han demostrado las respuestas de distintas especies acuáticas a un determinado contaminante (Richardson *et al.*, 2008; Tkachenko *et al.*, 2013; Samanta *et al.*, 2014a, b). A partir de estos resultados, se ha incrementado el interés de determinar en los organismos, distintas alteraciones que den un indicio de lo que está sucediendo ambientalmente. El análisis de lo que causa un solo xenobiótico en el organismo es de suma importancia, ya que se conoce de esa manera la respuesta biológica específica a la sustancia en cuestión. Sin embargo, dado que las condiciones de los bioensayos son altamente controladas y constantes (temperatura, salinidad, turbidez, oxígeno disuelto, presencia de otros compuestos, etc.), y que se está analizando el efecto de un solo contaminante en particular (o en todo caso una mezcla específica de ellos), este tipo de enfoque presenta una gran limitación en la interpretación de lo que sucede realmente en los ecosistemas. Asimismo, los contaminantes en el ambiente aparecen como mezclas complejas que pueden causar efectos interactivos de sinergia o antagonismo sobre la biota; a esto se le suman las variaciones fisicoquímicas del ambiente que también pueden influenciar sobre la biodisponibilidad de los contaminantes y/o sobre el metabolismo de absorción/eliminación de los organismos (Logan, 2007). Por ello, es de suma importancia evaluar las respuestas biológicas que experimentan distintos organismos frente a los impactos ambientales/antrópicos en su hábitat natural.

De acuerdo a la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades de los Estados Unidos, los biomarcadores pueden clasificarse en: biomarcadores de exposición, los cuales determinan la presencia de un xenobiótico o su metabolito; bio-



marcadores de efecto, que miden cualquier alteración en un determinado organismo (bioquímico, biológico o de comportamiento); y biomarcadores de susceptibilidad, los cuales son parámetros celulares o moleculares que permiten identificar la vulnerabilidad relativa de un determinado organismo (ATSDR, 1994). Asimismo, de acuerdo a los distintos niveles de organización biológica, existen diversos niveles para los biomarcadores. A grandes rasgos podemos reconocer tres niveles de organización: Los biomarcadores fisiológicos y de comportamiento que hacen referencia al estado de salud general del organismo y en la mayoría de los casos abarcan parámetros como el índice de condición, índice hepatosomático y estado gonadosomático (Toro-Restrepo, 2011). Los biomarcadores histológicos que están en un nivel intermedio de la biología de los organismos y detectan las alteraciones en los órganos y tejidos (Reddy y Rawat, 2013; Yancheva *et al.*, 2015). Por último, los biomarcadores bioquímicos, moleculares y genéticos que hacen referencia al estudio de las macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos o carbohidra-

tos), en las cuales una alteración en su estructura o función puede ser usada como una indicación de la exposición a xenobióticos (Toro-Restrepo, 2011; Hook *et al.*, 2014). A éstos últimos biomarcadores se los reconoce también como indicadores de alerta temprana, dado que se encuentran en el nivel más inferior de la organización biológica, y el reconocimiento de una alteración en éstos, puede anticipar el efecto más perjudicial que un contaminante potencialmente tiene sobre un organismo antes de que se vea afectado un nivel más elevado de la organización biológica (Sarkar *et al.*, 2006).

El objetivo de este trabajo fue revisar las investigaciones en las que se utilizaron biomarcadores para el monitoreo ambiental marino durante los últimos 10 años en el continente americano, teniendo en cuenta las distintas clasificaciones, con el fin de dar cuenta del estado de conocimiento que, eventualmente podría facilitar su utilización como herramienta diagnóstica y consecuentemente dar base a gestiones ambientales de alta relevancia ecológica.

Análisis ecotoxicológicos en América

Diversos análisis ecotoxicológicos, realizados en los últimos 10 años para la evaluación de los ecosistemas marinos en América, han sido considerados para esta revisión. Una parte de éstos se ha enfocado en la relación de efectos con xenobióticos específicos como metales, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), organoclorados (OCs), bifenilos policlorados (BPCs) y bifenilos polibromados (PBDE); y otra parte ha evaluado contaminantes no específicos, como zonas de alto impacto antrópico, zonas cercanas a derrames de petróleo y zonas de descargas industriales y/o urbanas, generalmente utilizando un área menos impactada de referencia para su comparación. Teniendo en cuenta los trabajos revisados, Brasil es el país con el mayor número de trabajos, seguido de Argentina > Mé-

xico > Estados Unidos > Chile. Canadá, Uruguay y Venezuela cuentan con escasa información en la evaluación de biomarcadores. Además, no existe información en países localizados en América central y algunos países de América del sur (figura 1A). Considerando todas las publicaciones revisadas, se observó un promedio de cuatro publicaciones por año, siendo el 2017, el año que cuenta con el mayor número de trabajos (figura 1B).

Es común analizar organismos modelos para la evaluación de la contaminación; a estos organismos se los suele denominar bioindicadores (Lionetto *et al.*, 2019). La elección de un bioindicador adecuado puede ser un desafío, ya que deben transmitir información sensible, significativa, confiable y reproducible. Los distintos organismos presentan

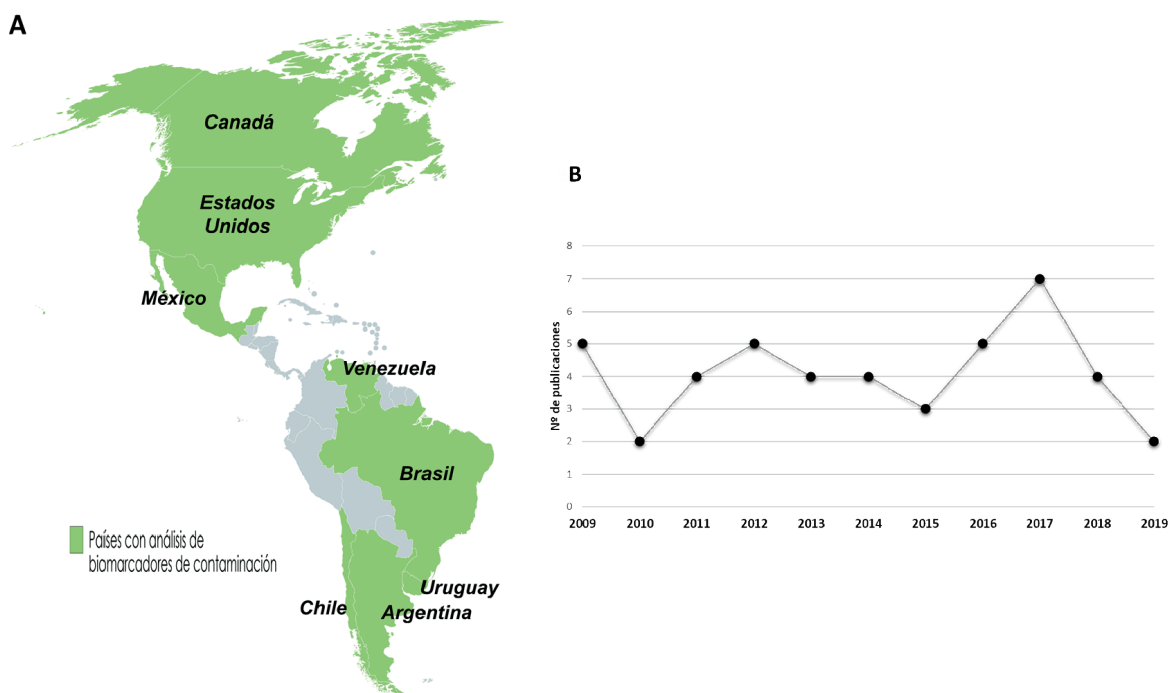


Figura 1. Distribución de publicaciones basadas en análisis ecotoxicológicos en los últimos diez años para América, por país (A) y por año de publicación (B).

distintas ventajas y desventajas, por lo que la elección de los más apropiados para la evaluación de un ecosistema depende de los objetivos específicos de la investigación (Yancheva *et al.*, 2018). Dentro de la clasificación de bioindicadores, se encuentran los organismos centinelas, que, debido a su sensibilidad a los contaminantes químicos, proporcionan señales de los posibles efectos adversos e información sobre los mecanismos tóxicos de éstos (González *et al.*, 2014). En general, los organismos más usados son los invertebrados, ya que poseen ventajas tales como la limitada movilidad, amplia distribución y menor tasa metabólica en comparación con vertebrados. Los peces también son comúnmente usados en ambientes acuáticos, aunque en menor medida que los invertebrados. En su contraparte, el uso de anfibios, reptiles y mamíferos es muy escaso en trabajos a nivel mundial (Siddig *et al.*, 2016; Yancheva *et al.*, 2018). Para las costas del continente americano, los organismos analiza-

dos con mayor frecuencia de acuerdo con los trabajos revisados fueron peces, seguidos por bivalvos y luego tortugas marinas. La mayoría de los trabajos realizados en peces y bivalvos se centraron en Brasil y Argentina, mientras que los trabajos realizados en tortugas marinas fueron llevados a cabo en Estados Unidos y México. En menor medida se realizaron estudios en gasterópodos, decápodos y mamíferos marinos; y, finalmente se encontró muy escasa información en cirrípedos y tiburones (figura 2).

A pesar de que hay diferentes clasificaciones para los bioindicadores, en estricto sentido, estos están enfocados en proporcionar información más de tipo cualitativa sobre la calidad ambiental, a través de cambios en la abundancia o presencia/ausencia de los organismos en un ambiente determinado. Mientras los biomarcadores son definidos como cambios fisiológicos, morfológicos, genéticos y otros cambios medibles en los organismos, asociados a la exposición de algún estresor, por lo tanto,

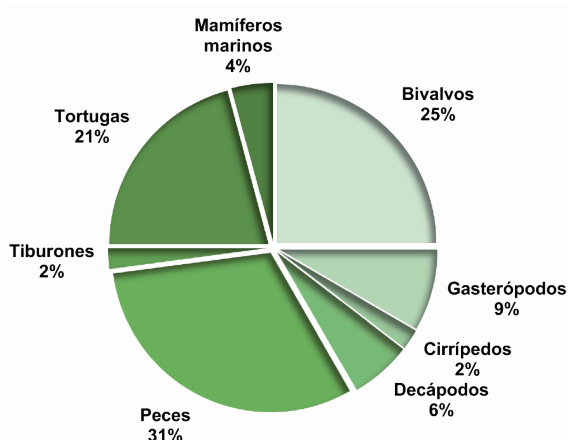


Figura 2. Organismos usados para la evaluación del impacto ambiental en los últimos diez años para América, ordenados por clases, familias o grupos.

pueden medir de manera cuantitativa la intensidad del disturbio. En cualquier caso, tanto los bioindicadores como los biomarcadores deberían desarrollarse en conjunto como herramienta de evaluación primaria (González *et al.*, 2014).

Biomarcadores biométricos (morfológicos e índices corporales).

Un cambio en los índices corporales (biométricos y morfológicos) de los organismos puede ser indicativo de algún efecto adverso y son generalmente usados como biomarcadores de detección inicial. Sin embargo, estos parámetros no suelen ser muy específicos debido a que pueden ser afectados por otras variables. Aun así, no deberían pasarse por alto en la evaluación del impacto ambiental, ya que permiten a través de mediciones rápidas, simples y de bajo costo, identificar a los miembros más sensibles y vulnerables de una población. Además, estos índices podrían proporcionar información sobre las reservas de energía y la capacidad de los organismos para tolerar tóxicos o el estrés ambiental (van der Oost *et al.*, 2003).

El índice hepatosomático (IHS) es uno de los más relacionados a la exposición de contaminantes debido a que el hígado es el principal órgano de detoxificación y un órgano diana relacionado con importantes procesos metabólicos (Morado *et al.*, 2017). También, el índice de condición (IC) es comúnmente usado como un biomarcador, proporciona información sobre el equilibrio energético de los organismos, que suele ser afectado por procesos de detoxificación (Dalzochio *et al.*, 2016; Morado

et al., 2017). El IC es un importante criterio a tener en cuenta en la evaluación ambiental, ya que mantener un presupuesto energético positivo es clave en la sobrevivencia de los organismos (Toro-Resrepo, 2011).

En los trabajos revisados para América, se demostró como biomarcador biométrico efectivo, la longitud curva del caparazón (CCL) en tortugas marinas. En Brasil, con relación a metales en la sangre de *Chelonia mydas* (tortuga verde), se evidenció que la CCL correlacionó negativamente con selenio y positivamente con zinc, plomo y cesio (Setim *et al.*, 2015). También en México, se evaluaron concentraciones de metales en diferentes tejidos de *Lepidochelys olivacea* (tortuga olivácea) que correlacionaron significativamente con la CCL, de forma negativa y positiva para distintos metales y tejidos (Cortés-Gómez *et al.*, 2014); y en Estados Unidos se observó una correlación negativa del CCL con brevetoxinas, una toxina proveniente de floraciones algales nocivas en la tortuga lora, *Lepidochelys kempii* (Perrault *et al.*, 2014).

Otro biomarcador biométrico se evaluó para el pez *Trichiurus lepturus*, donde se observó una correlación positiva de la longitud y peso total con las



concentraciones de mercurio en el músculo (Pereira *et al.*, 2009); y para el gasterópodo (*Lottia subrugosa*) se observó menor peso, altura y espesor de la concha para los organismos provenientes de sitios donde los sedimentos estaban contaminados con HAPs, BPCs y OCs (Nicao *et al.*, 2017).

También distintas alteraciones morfológicas en gasterópodos fueron relacionadas con la presencia de contaminantes, en el sistema de estuarios de Santos (Brasil) Nicao *et al.* (2017) observaron cambios en la gravedad específica de la concha de *Lottia subrugosa*, decreciendo significativamente desde los sitios más a menos contaminados con HAPs, PCBs y DDTs. Por otro lado, en Golfo Nuevo (Argentina) Márquez *et al.* (2017), observaron cambios en la forma de la concha de *Buccinanops globulosus*, evidenciando una forma más globular en estrecha relación con áreas de alto impacto portuario en zonas cercanas a la ciudad de Puerto Madryn, los autores lo explican como una posible adaptación del organismo para tener menor superficie de contacto con el sedimento contaminado. También en Golfo Nuevo (Argentina), se observaron cambios en la forma del caparazón del cangrejo *Ovalipes trima-culatus* en relación con un sitio contaminado, demostrando un aumento significativo de puntos de asimetría en un área contaminada (media= 4,54), en comparación con un área de contaminación no detectada (media= 3,30; Lezcano *et al.*, 2015).

Con respecto al índice de condición para bivalvos y el factor de condición equivalente en peces, se describieron correlaciones negativas con relación a la presencia de metales, HAPs y zonas con reconocido impacto antrópico (Arrighetti *et al.*, 2019; Buzzi y Marcovecchio, 2018; Leonardi *et al.*, 2009; Recabarren-Villalón *et al.*, 2019).

En Leonardi *et al.* (2009), se observaron longitudes totales, pesos, índices de condición y hepatosomáticos considerablemente menores en peces

demersales (*Paralichthys adspersus*) proveniente de un área contaminada en comparación con un sitio de referencia; mientras que Carvalho-Neta y Abreu-Silva (2010), evidenciaron una disminución en el índice gonadosomático en peces procedentes de un área con mayor impacto antrópico, sugiriendo efectos de los contaminantes sobre la reproducción de los organismos. El índice gonadosomático, también demostró ser un buen biomarcador de HAPs en *Atherinella brasiliensis*, los autores lo evaluaron en conjunto con el factor de condición e índice hepatosomático, sin embargo, solo el gonadosomático mostró relación con las concentraciones de HAPs encontradas, explicado como probable interferencia de algún otro contaminante (de Oliveira *et al.*, 2013). Es importante destacar, que las alteraciones en la capacidad reproductiva de los organismos son consideradas como los efectos más dañinos de los contaminantes, ya que puede amenazar la continuidad de las especies vulnerables, especialmente las que tienen bajas tasas reproductivas (van der Oost *et al.*, 2003).

Un trabajo de Canadá propone el uso de tres biomarcadores en bivalvos que son simples de determinar, efectivos y de bajo costo. Considerando estudios de campo, describen más de una década de monitoreo en Saguenay Fjord, Quebec, Canadá. Durante el transcurso de éste, el índice de condición y el índice gonadosomático han mostrado correlaciones significativas con otros biomarcadores, lo que apoya firmemente su uso para el monitoreo de calidad de agua desde un punto de vista eco-epidemiológico. Junto con esto, se evaluó el tiempo de supervivencia en el aire (SOS). Los tres biomarcadores demostraron ser efectivos para bivalvos marinos y los autores corroboran su uso como apropiados biomarcadores para proteger y conservar la calidad del agua a nivel mundial (Blaise *et al.*, 2017).



Biomarcadores histológicos

Los análisis histopatológicos pueden definirse como biomarcadores sensitivos en la evaluación de ciertos compuestos tóxicos. Sin embargo, presentan algunas desventajas, ya que son invasivos, costosos y requieren tiempo para su realización (Reddy y Rawat, 2013; Yancheva *et al.*, 2015). Las branquias e hígados son los tejidos más comúnmente usados para este tipo de estudios, ya que representan importantes órganos diana en el metabolismo de los

compuestos químicos que pueden causar daño a nivel tisular y celular (Yancheva *et al.*, 2015).

Los tejidos analizados en los trabajos revisados fueron: glándulas digestivas, branquias, gónadas, hígado, bazo y piel. Se realizaron análisis histopatológicos, morfométricos, estereológicos de composición celular e integridad del tejido a través de técnicas histológicas en organismos provenientes de zonas impactadas, todos resumidos en la tabla 1.

Tabla 1. Efectos descritos como biomarcadores histológicos en los organismos asociados a zonas contaminadas de América.

Especie	País	Tejido	Efecto	Referencia
<i>Brachidontes rodriguezii</i>	Argentina	Glándula digestiva	Atrofia severa de túbulos digestivos con ampliación del lumen y reducción de células epiteliales. Tejido conectivo intersticial desorganizado. En algunos casos, ausencia de células epiteliales. Lumen de los túbulos digestivos con frecuencia lleno de desechos celulares y hemocitos. Respuestas inflamatorias e infiltración hemocítica difusa del tejido conjuntivo vesicular. Presencia de sustancias similares a la lipofuscina en las células epiteliales. Necrosis en los túbulos digestivos. Núcleos generalmente fragmentados en micronúcleos y macronúcleos. Aumento de relación luminal media (MLR), disminución de grosor epitelial medio digestivo (MET) y de la relación diverticular media digestiva (MDR). Aumento de la relación MLR/MET y disminución de la relación MET/MDR. Aumento del volumen de las células basófilas en la glándula digestiva.	Arrighetti <i>et al.</i> , 2019
		Branquias	Disminución en el número de uniones inter-filamentosas del filamento branquial. Alteraciones morfológicas, reducción en número y longitud de los cilios, engrosamiento y desorganización del epitelio; e infiltración de hemocitos. Aumento aparente del número de células secretoras.	
		Gónada	En hembras, aumento de ovocitos degenerativos y necróticos. Folículos completamente atrofiados, evidenciados por un lumen lleno de restos celulares amarillos. En machos, disminución de tejido adipogranular con túbulos espermatogénicos vacíos de gametos maduros.	
<i>Cathorops spixii</i>	Brasil	Branquias	Fusiones lamelares y aneurisma.	Azevedo <i>et al.</i> , 2013
		Hígado	Necrosis, señales de lesiones hepáticas y respuestas inflamatorias.	
<i>Atherinella brasiliensis</i>	Brasil	Branquias	Mayor incidencia de neoplasia en laminillas secundarias y aneurisma.	de Oliveira <i>et al.</i> , 2013
		Hígado	Necrosis, esteatosis del citoplasma en hepatocitos y neoplasia.	
<i>Paralichthys adspersus</i>	Chile	Branquias	Telangiectasias laminares, edema localizado en la base de las laminillas, edema generalizado en las láminas secundarias y fusión de lamelas secundarias.	Leonardi <i>et al.</i> , 2009
		Piel	Hiperplasia epidérmica, dermatitis crónica.	
		Bazo	Presencia de hemosiderina.	
		Hígado	Focos de alteración celular, presencia de centros melanomacrófagos, vacuolización hidrópica del conducto biliar y signos de hepatitis.	



Biomarcadores moleculares

Muchos contaminantes tienen efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos en los organismos, por lo que comúnmente también se utilizan biomarcadores de genotoxicidad para la evaluación del impacto ambiental en los ecosistemas. Se han descrito como indicadores sensibles, las anomalías en cromosomas estándar, intercambio entre cromátidas hermanas y anomalías en los núcleos de eritrocitos en peces; y, con menor sensibilidad, se ha evaluado la presencia de micronúcleos. A pesar de que, son técnicas que han demostrado prometedoros resultados, suelen ser laboriosas, lo que limita su uso como ensayos de detección de rutina (van der Oost *et al.*, 2003).

En los trabajos revisados para América, los biomarcadores utilizados fueron daño en el ADN, frecuencia de micronúcleos y anomalías en los núcleos de los eritrocitos en peces; y, en todos los casos, se relaciona el aumento de éstos con la presencia de contaminantes o con zonas de alto impacto antrópico. Con respecto al daño en el ADN, se encontraron cuatro trabajos, todos pertenecientes a Brasil. Específicamente, en Davanzo *et al.* (2013) se demostró para una zona contaminada, que el cangrejo *Goniopsis cruentata* presentó un aumento en el daño del ADN. También en Nicao *et al.* (2017) se encontró que el daño genético en el gasterópodo *Lottia subrugosa* estaba en relación con la presencia de HAPs y BPCs. Asimismo, se observó para dos especies de peces capturadas en una zona impactada por un derrame de petróleo en Brasil (*Atherinella brasiliensis* y *Cathorops spixii*), un aumento en el daño del DNA junto con algunas alteraciones nucleares y la presencia de micronúcleos (de Oliveira *et al.*, 2013; Katsumiti *et al.*, 2009). El aumento de micronúcleos también concuerda para

otras especies de peces, *Odontesthes argentinensis* y *Centropomus parallelus*, capturadas en zonas de alto impacto antrópico de Uruguay y Brasil, respectivamente (Gutiérrez *et al.*, 2015; Kirschbaum *et al.*, 2009) y cuatro especies de bivalvos (*Mytilus edulis*, *Brachidontes rodriguezii*, *Aulacomya atra atra* y *Perumytilus purpuratus*) colectados en una zona de descarga industrial (Machado-Shiaffino *et al.*, 2009) en Argentina. Solo un trabajo en Brasil evidenció un aumento de anomalías en los núcleos de los eritrocitos en la especie *C. spixii* relacionadas con una zona de impacto antrópico (de Souza Azevedo *et al.*, 2012).

Como biomarcadores moleculares, se ha descrito la determinación en la expresión génica de algunas macromoléculas que participan en procesos de detoxificación, sin embargo, la especificidad causa-efecto aún es difícil de establecer (Livingstone, 1993; Toro-Restrepo, 2011). Para los trabajos encontrados en América, varios autores utilizaron técnicas moleculares para la identificación de estos biomarcadores, observando la expresión génica de enzimas o expresión de ciertas proteínas en distintos tejidos como se resumen en las tablas 2 y 3. Para el caso de las enzimas, se demostró que en algunas ocasiones, la expresión génica no correspondía con su actividad. Esto puede deberse a que muchas enzimas muestran un comportamiento bifásico, observado comúnmente en organismos marinos, como consecuencia de una exposición prolongada a los contaminantes, donde se evidencia un aumento en la actividad como respuesta inicial, seguida de una disminución progresiva, incluso cuando hay un aumento de la expresión génica (Cortés-Gómez *et al.*, 2018).



Tabla 2. Biomarcadores moleculares a nivel génico utilizados en los últimos 10 años en América.

Especie	País	Biomarcador	Contaminante	Efecto	Referencia
<i>Mytilus edulis</i>	Brasil	sod1	Zona de impacto antrópico	Inducción expresión en branquias y músculo.	Coimbra <i>et al.</i> , 2012
		gstII		Inducción expresión en branquias.	
		hsp70		Inducción expresión en branquias y músculo.	
<i>Lepidochelys olivacea</i>	México	cat	Metales	Hígado: inhibición con cromo, hierro y talio. Riñón: inducción con cromo y níquel e inhibición con cadmio. Sangre: inducción con cadmio.	Cortés-Gómez <i>et al.</i> , 2018
		Gr		Hígado: inducción de la expresión con arsénico, cromo, hierro, níquel y cromo. Riñón: inducción con cadmio, zinc y níquel.	
		Mt		Inducción de la expresión con arsénico e inhibición con cobre en riñones.	
		sod		Inducción de la expresión con arsénico, cadmio, cromo, hierro, níquel, plomo y zinc en hígado y con cromo en riñones	
<i>Ocyurus chysurus</i>	México	GsT	HAPs	Inducción de la expresión en hígado.	Gold-Bouchot <i>et al.</i> , 2017
		CYP1A		Inducción de la expresión en hígado.	
<i>Argopecten purpuratus</i>	Chile	GsT	Metales	Inducción de la expresión en glándula digestiva.	Zapata <i>et al.</i> , 2012
		HSP70		Inducción de la expresión en glándula digestiva.	

Tabla 3. Biomarcadores moleculares a nivel de expresión de proteínas utilizados en los últimos 10 años en América.

Especie	País	Biomarcador	Contaminante	Efecto	Referencia
<i>Rhincodon typus</i>	México	Proteína CYP1A	Polibromodifenil éteres (PBDEs)	Correlación positiva con PBDE 183 y negativa con PBDE 196	Fossi <i>et al.</i> , 2017
<i>Argopecten purpuratus</i>	Chile	Proteína MT	Metales	Inducción de la expresión en glándula digestiva	Zapata <i>et al.</i> , 2012

Biomarcadores bioquímicos

Biomarcadores de estrés oxidativo

Durante situaciones de estrés ambiental, que incluye la presencia de contaminantes como plaguicidas, metales y HAPs, los organismos marinos experimentan un aumento en el estrés oxidativo (Hook *et al.*, 2014). Los contaminantes ambientales generalmente son biotransformados en las células, formando radicales hidroxilos que pueden

dañar componentes celulares, tales como lípidos, proteínas y ADN. Por ello, la determinación de los niveles de la peroxidación de lípidos y proteínas se ha utilizado comúnmente como biomarcador de estrés ambiental y una señal de daño celular. En los trabajos revisados para América, la determinación de la peroxidación lipídica (LPO) fue una de las alteraciones más frecuentemente determinada,



evidenciándose siempre un aumento en relación con la presencia de contaminantes, como metales (Comoglio *et al.*, 2011; Duarte *et al.*, 2011, Guiarratano *et al.*, 2014; Zapata-Vívenes *et al.*, 2012), HAPs (Recabarren-Villalón *et al.*, 2019; Ronda *et al.*, 2018), BPCs (Nicao *et al.*, 2017), y OCs y DDTs (Labrada Martagon *et al.*, 2011) (figura 3).

La extensión del daño debido al estrés depende de las defensas antioxidantes del organismo, que incluye enzimas, pequeñas moléculas antioxidantes libres, como el glutatión reducido (GSH) y proteínas como las metalotioneínas (MT). La determinación de la actividad de enzimas antioxidantes es también usada en monitoreos ambientales, ya que éstas responden de forma rápida y sensitiva a los contaminantes. Entre estas enzimas se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), una metaloenzima que cataliza la transformación de aniones superóxidos en peróxido de hidrógeno (ambas, especies reactivas del oxígeno, ROS) y la catalasa (CAT), que cataliza la reacción que reduce el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La GSH a su vez, reduce las formas conjugadas de xenobióticos electrofílicos transformándolos en productos fáciles de excretar; y las metalotioneínas son fundamentales en la regulación de metales esenciales y en la detoxificación de metales no esenciales (Andersen *et al.*, 2006; Kroon *et al.*, 2017; Valavanidis *et al.*, 2006; van der Oost *et al.*, 2003).

En los trabajos revisados, el biomarcador enzimático de estrés oxidativo más utilizado fue la determinación de la actividad de CAT (figura 3); ésta se utilizó en 10 trabajos distintos en relación con metales (Comoglio *et al.*, 2011; Duarte *et al.*, 2011; Guiarratano *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2013; Cortés-Gómez *et al.*, 2018), OCs (Labrada Martagon *et al.*, 2011; Salvarani *et al.*, 2018; Tremblay *et al.*, 2016) y con zonas de alto impacto antrópico (Carvalho-Neta y Abreu-Silva, 2010; Coimbra *et al.*, 2012). En todos los casos se reportó un aumento de la actividad, en diferentes especies y tejidos, con excepción del trabajo de Coimbra *et al.* (2012), que reportó una menor actividad en el sitio impactado en comparación el sitio control en el tejido muscular del bivalvo *Mytilus edulis*. Los autores atribuyen este comportamiento a una señal de exposición crónica a contaminantes. SOD fue la segunda enzima biomarcadora más usada y la mayoría de los trabajos evidencia una correlación positiva de su actividad con contaminantes (Comoglio *et al.*, 2011; Giarratano *et al.*, 2014; Coimbra *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2013; Labrada Martagon *et al.*, 2011) a excepción de Cortés-Gómez *et al.* (2018), que, aunque describen un aumento de SOD en plasma, también observaron inhibición de la actividad en hígado y riñones de la tortuga *Lepidochelys olivacea*. Con respecto a MT, cinco autores usaron este biomarcador, pero sólo tres lo

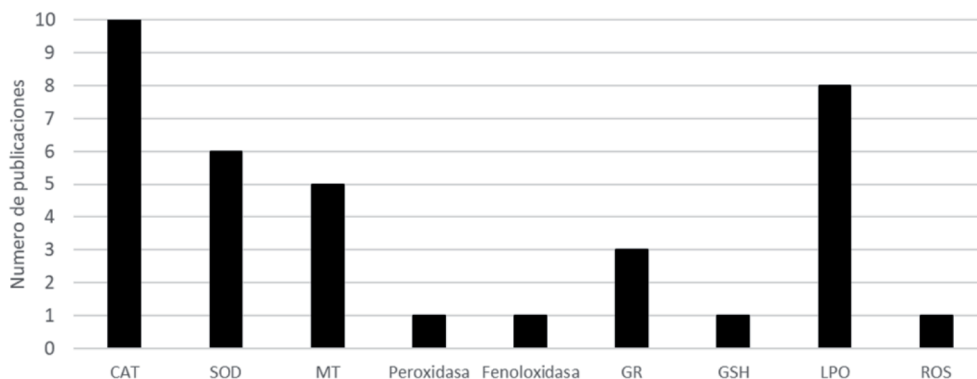


Figura 3. Biomarcadores de estrés oxidativo más usados durante los últimos 10 años para América.



describieron como un biomarcador efectivo y todos correspondieron a invertebrados. En un trabajo publicado por Buzzi y Marcovecchio (2016) se demostró que el cangrejo *Neohelice granulata* disminuyó la actividad de metalotioneínas tras un periodo de depuración de metales en el laboratorio. También se han demostrado correlaciones de la actividad de metalotioneínas con aluminio en el bivalvo *Aulacomya atra atra* (Giarratano *et al.*, 2014); y en el bivalvo *Perna perna*, con correlaciones negativas en el tejido muscular con níquel, cobre, zinc, arsénico, selenio, cadmio y plomo; y correlaciones positivas y negativas con distintos metales en la glándula digestiva según la estación de muestreo (Lavradas *et al.*, 2016). La glutatión reductasa (GR) mostró distintos comportamientos en respuesta a OCs incluso para la misma especie (*Eretmochelys imbricata*), correlacionando con endosulfán, clordano, metoxiclor y hexacloroetano en Salvarani *et al.* (2018), y mostrando tendencia disminuir con hexacloroetano en Tremblay *et al.* (2016); aunque en éste, los autores alertan probables interferencias de otros contaminantes. Con respecto a metales, la GR mostró un aumento de la actividad y GSH mostró distintos comportamientos con diferentes metales (Cortés-Gómez *et al.*, 2018; Lavradas *et al.*, 2016). Por último, algunos trabajos, también reportaron la presencia de ROS (Giarratano *et al.*, 2014) y la actividad de enzimas como fenoloxidasa y peroxidasa (Laitano y Fernández-Gimenez, 2016), todas resumidas en la figura 3.

Biomarcadores enzimáticos metabólicos y de biotransformación

La biotransformación es un proceso que ocurre en dos fases (I y II) en el que los organismos transforman los xenobióticos en productos de fácil excreción. La mayoría de las reacciones de la fase I ocurren dentro del sistema monooxigenasa dependiente de la proteína citocromo P450. El contenido total de esta enzima y sus isoenzimas, como el citocromo P450 1A (CYP 1A) han sido utilizados como biomarcadores altamente específicos para

HAPs y BPCs. Para los trabajos revisados en América, no se ha investigado aún la actividad de este citocromo oxidasa en función de la concentración de HAPs para ningún organismo, sin embargo, se ha investigado su expresión génica en relación con la presencia de HAPs y su expresión a nivel de proteínas en relación con PBDEs, como se muestra en la tabla 2.

En la fase II, las principales moléculas involucradas son la glutatión s-transferasa (GST) que cataliza la conjugación de xenobióticos a GSH. Mientras la actividad de GST aumenta con la exposición de los organismos a los xenobióticos, es esperable que los niveles de GSH disminuyan (Andersen *et al.*, 2006; van der Oost *et al.*, 2003). La mayor parte de los trabajos reportó un aumento de la actividad de GST frente a contaminantes (Duarte *et al.*, 2011; Giarratano *et al.*, 2014; Laitano y Fernández-Gimenez, 2016; Azevedo *et al.*, 2013; Carvalho-Neta y Abreu-Silva, 2010; Coimbra *et al.*, 2012; Labrada Martagon *et al.*, 2011), aunque también se evidenció una inhibición en branquias del cangrejo *Goniopsis cruentata* y en hígado del pez *Centropomus parallelus* (Davanso *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2013).

Durante los procesos de biotransformación y estrés oxidativo, los organismos utilizan procesos metabólicos regulados por enzimas, generalmente como mecanismos compensatorios de energía. Las transaminasas, como la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) participan en la interconversión de carbohidratos y el metabolismo de proteínas; y la lactato deshidrogenasa (LDH) tiene un rol clave en el equilibrio del catabolismo y anabolismo de carbohidratos. Se ha demostrado que, en peces bajo condiciones de estrés, por un lado, las enzimas metabólicas mencionadas activan procesos compensatorios para satisfacer las altas demandas energéticas; y, por otro lado, su presencia y actividad en plasma, con una consiguiente disminución en el tejido, puede ser indicativo de daño celular (Kroon *et al.*, 2017; Ronda *et al.*, 2018). Otras enzimas como la fosfatasa alcalina (ALP), encargada de catalizar



la desfosforilación, es usada comúnmente como biomarcador de compuestos hepatotóxicos. Se ha demostrado que la observación de alteraciones en su comportamiento puede ser una señal de daño hepático (Tavares *et al.*, 2018; Ronda *et al.*, 2018; Kroon *et al.*, 2017). Asimismo, la creatina quinasa (CK), con la función de catalizar la regeneración reversible del ATP, puede ser utilizado como un biomarcador indirecto de daño muscular (Ronda *et al.*, 2018). Para América, se encontraron muy pocos trabajos relacionados con procesos metabólicos como biomarcadores en organismos marinos. Las enzimas ALT, AST y LDH fueron descritas como biomarcadores de contaminación efectivos en dos trabajos de peces en Argentina. Específicamente para *Ramnogaster arcuata* se describe una correlación positiva de ALT y AST en el hígado, y una correlación negativa de LDH en tejido muscular con la presencia de HAPs en tejido muscular (Ronda *et al.*, 2018). En cambio, en otra especie de pez, *Cynoscion guatucupa* ALT y AST muestran una tendencia a disminuir en el tejido hepático con la presencia de HAPs en tejido muscular, asimismo LDH correlaciona positivamente con las concentraciones de HAPs totales (Recabarren-Villalón *et al.*, 2019). La interpretación de los resultados obtenidos con enzimas metabólicas en cada tejido debe ser leída dentro de un contexto general, determinando otros parámetros metabólicos, dado que un aumento o disminución en la actividad de estas enzimas por sí solas puede estar relacionado con procesos diferentes. Por ello para la interpretación de los resultados, en ambos trabajos se midieron niveles de proteínas y la peroxidación lipídica. Ronda *et al.* (2018) también describen una correlación positiva entre ALP y antraceno; y CK en hígado con acenafteno, donde al mismo tiempo correlacionó negativamente con fluoranteno, pireno, benzo(b) fluoranteno y benzo(a)pireno. Finalmente, en Venezuela, en el bivalvo *Perna viridis* se evidenció una disminución de proteínas que podría ser asociado a procesos de gluconeogénesis, (Zapata-Vívenes *et al.*, 2012); asimismo, una disminución de glucógeno fue reportada en la glándula digestiva de

Brachidontes rodriguezii en un sitio contaminado de Argentina, un biomarcador importante considerando que ésta es la reserva primaria de energía en bivalvos (Arrighetti *et al.*, 2019).

Biomarcadores neurotóxicos

La actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) es inhibida por algunos plaguicidas, como organofosforados y carbamatos. Esta relación ha sido ampliamente estudiada tanto en vertebrados como invertebrados y es bastante específica, aunque puede ser afectada por la acción de algunos microorganismos del suelo y pigmentos de zooxantarias que causan el mismo efecto (Monserrat *et al.*, 2007). En los trabajos revisados para América, se observó inhibición de la actividad de colinesterasas en cangrejos *Goniopsis cruentata* muestreados cercanos a un área agrícola, posiblemente contaminada por plaguicidas (Davanso *et al.*, 2013). También se observó la inhibición de esta enzima en distintas especies de peces provenientes de zonas antrópicamente impactadas: *Atherinella brasiliensis* (de Oliveira *et al.*, 2013) y *Cathorops spixii* (Azevedo *et al.*, 2013). En la tortuga marina *Eretmochelys imbricata* la disminución de la actividad de AChE se evidenció en relación con concentraciones de hexaclorohexano (Tremblay *et al.*, 2016). En este trabajo también se demostró una inhibición de la butirilcolinesterasa (BChE) en relación al heptacloro, en concordancia con el mamífero marino *Trichechus manatus*, en el que la BChE se observó inhibida en dos sitios probablemente contaminados por OCs, debido a su cercanía a cultivos de caña de azúcar donde el carbofurano es comúnmente utilizado (Anzolin *et al.*, 2012).

Biomarcadores hematológicos

Varios autores de los trabajos revisados han clasificado algunos parámetros hematológicos como biomarcadores fisiológicos, debido a que éstos dan información del estado de salud en general y de la fisiología de los organismos. Los biomarcadores hematológicos suelen ser menos específicos que otros biomarcadores, sin embargo, ofrecen la



posibilidad de hacer pruebas no letales (Kroon *et al.*, 2017). En algunos de los trabajos revisados, los minerales como el sodio, el cloruro, el potasio y la osmolaridad plasmática han sido medidos como biomarcadores hematológicos en peces y tortugas para zonas impactadas por derrames de petróleo y metales (Souza-Bastos y Freire, 2011; Katsumiti *et al.*, 2009; Perrault *et al.*, 2017). Conservar estos parámetros en equilibrio es clave para mantener el potencial de membrana a través de la célula (Kroon *et al.*, 2017), y fundamental en organismos eurihalinos (de estuarios) en los que la osmorregulación es una adaptación fisiológica imprescindible.

El hematocrito, la concentración de hemoglobina u otros componentes de la sangre, son parámetros también comúnmente utilizados como biomarcadores, ya que se ha demostrado que se alteran en presencia de contaminantes (Kroon *et al.*, 2017). En los trabajos analizados para esta revisión, se utilizaron como biomarcadores hematológicos el volumen corpuscular medio, la concentración de hemoglobina, la hemoglobina corpuscular media, el hematocrito, la determinación de globulinas (alfa-globulinas, gamma-globulinas), linfocitos y monocitos, para distintos organismos. Específicamente se observó en mamíferos marinos en respuesta a metales (Anzolin *et al.*, 2012), en peces provenientes de una zona de alto impacto antrópico (Seriani *et al.*, 2010) y en dos especies de tortugas marinas expuestas a brevetoxinas y metales (Perrault *et al.*, 2014, 2017).

Otros parámetros en suero, como la concentración de glucosa, albúmina y proteínas totales suelen analizarse para evaluar el estado nutricional de peces, un criterio importante en la evaluación del impacto ambiental (Kroon *et al.*, 2017; van der Oost *et al.*, 2003). En la tortuga *Caretta caretta*, se realizaron mediciones como niveles de albúmina, proteínas y sólidos totales; todos estos parámetros disminuyeron en relación con plomo y selenio (Perrault *et al.*, 2017). En este último trabajo, por exposición al plomo, también se evidenció en plasma un aumento de magnesio y una disminución de hierro.

Dos trabajos evaluaron el cortisol en plasma, una hormona utilizada como biomarcador que indica que los organismos se encuentran bajo condiciones de estrés. Específicamente, Souza Bastos y Freire (2011), observaron un incremento de cortisol en peces (*Atherinella brasiliensis*) durante los meses posteriores a un derrame de petróleo; sin embargo, los autores alertan que es un parámetro variable, especialmente en organismos de hábitats con grandes variaciones fisicoquímicas. Asimismo, en la tortuga *Lepidochelys olivacea* se encontraron elevadas concentraciones de cortisol con relación al estroncio y una correlación negativa con el arsénico y el selenio. Sin embargo, los autores plantean que son necesarios más análisis y datos para un mejor entendimiento de las relaciones encontradas (Cortés-Gómez *et al.*, 2017). Este último trabajo, también plantea el primer registro de la actividad de esterasas a través de la medición específica de p-nitrofenil acetato esterasa en tortugas marinas; y, aunque el resultado esperado era un aumento de la actividad en relación con el aumento del cortisol, el resultado observado fue una correlación negativa, lo que podría sugerir la interferencia de otros contaminantes.

Souza-Bastos y Freire (2011) observaron por primera vez la inhibición de la anhidrasa carbónica en branquias de peces en relación con hidrocarburos, encontrando una estrecha relación además con perturbaciones en la osmoregulación, lo que apunta a disfunciones de esta enzima en su rol osmorregulador.

Biomarcadores inmunológicos

Aunque es poco frecuente, algunos parámetros inmunológicos pueden usarse como biomarcadores de contaminación basándose en que la exposición a contaminantes puede causar inmunosupresión de forma directa o indirecta en los organismos (Kroon *et al.* 2017; Montserrat *et al.*, 2007; van der Oost *et al.*, 2003). En los trabajos revisados para América, la actividad de células *Killer* y la fagocitosis, fueron utilizadas como biomarcadores inmunológicos en la tortuga *Caretta caretta* en relación con



la concentración de BPCs (Rousselet *et al.*, 2017) y en mejillón *Perna viridis* en un sitio contaminado (Zapata-Vívenes *et al.*, 2012).

Conclusiones

A lo largo de la revisión se describieron biomarcadores que resultaron ser efectivos, correspondiendo a distintos niveles de organización biológica, cada uno con diferentes ventajas y desventajas. De acuerdo con esto, los biomarcadores más usados fueron los bioquímicos y los fisiológicos, ambos pertenecientes a los menores niveles biológicos. La evaluación de este tipo de biomarcadores puede deberse a que suelen ser los más específicos, de fácil medición y facilitan la comprensión de los mecanismos de toxicidad de xenobióticos, aunque aún son susceptibles a ser afectados por otras variables. Todos los trabajos evaluaron respuestas integradas de múltiples biomarcadores y muchos incluyeron

los distintos niveles de organización biológica, dando mayor fuerza a sus conclusiones al reducir las posibilidades de error debido a factores de confusión. Esto evidencia grandes avances en términos del estado de conocimiento de los biomarcadores durante los últimos 10 años, considerando distintos ambientes y especies bioindicadoras que reafirman su incuestionable utilidad para la evaluación de riesgo ambiental. En adición, sienta las bases que deberían ser consideradas en futuras regulaciones para todos los países de América al momento de planificar las gestiones para la protección y la conservación de la calidad de los ambientes marino-costeros del continente.

Referencias

- Andersen, L., W.H.L. Siu, E.W.K. Ching, C.T. Kwok, F. Melville, C. Plummer, A. Storey y P.K.S. Lam, 2006. Antioxidant enzymes as biomarkers of environmental stress in oysters in Port Curtis. *Cooperative Research Centre for Coastal Zone, Estuary & Waterway Management*, Technical Report 70.
- Anzolin, D.G., J.E.S. Sarkis, E. Diaz, D.G. Soares, I.L. Serano, J.C.G. Borges, A.S. Souto, S. Taniguchi, R.C. Montone, A.C.D. Bainy y P.S.M. Carvalho, 2012. Contaminant concentrations, biochemical and hematological biomarkers in blood of West Indian manatees *Trichechus manatus* from Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 64: 1402–1408.
- Arrighetti, F., S.M. Landro, M.E. Lambre, P.E. Penchaszadeh y V. Teso, 2019. Multiple biomarker approach in the assessment of the health status of a novel sentinel mussel *Brachidontes rodriguezii* in a harbor area. *Marine Pollution Bulletin*, 140: 451–461.
- Azevedo, J.S., E.S. Braga, H.C. Silva de Assis y C.A. Oliveira, 2013. Biochemical changes in the liver and gill of *Cathorops spixii* collected seasonally in two Brazilian estuaries under varying influences of anthropogenic activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 96: 220–230.
- Barra, R., C. Castillo y J.P.M. Torres, 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the South American environment. *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer, New York. 1–22 p.p
- Blaise, C., F. Gagné y T. Burgeot, 2017. Three simple biomarkers useful in conducting water quality assessments with bivalve mollusks. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(36): 27662–27669.
- Buzzi, N.S. y J.E. Marcovecchio, 2016. A baseline study of the metallothioneins induction and its reversibility in *Neohelice granulata* from the Bahía Blanca Estuary (Argentina). *Marine Pollution Bulletin*, 112:452–458.
- Buzzi, N.S. y J.E. Marcovecchio, 2018. Heavy metal concentrations in sediments and in mussels from Argentinean coastal environments, South America. *Environmental Earth Sciences*, 77:321.



- Carvalho-Neta, R.N.F. y A.L. Abreu-Silva, 2010. *Sciades herbergii*, oxidative stress biomarkers: an *in situ* study of an estuarine ecosystem (São Marcos' bay, Maranhão, Brazil). *Brazilian Journal of Oceanography*, 58(special issue IICBBM): 11-17.
- Chapman, P.M., F. Wang, C.R. Janssen, R.R. Goulet y C.N. Kamunde, 2003. Conducting ecological risk assessments of inorganic metals and metalloids: current status. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 9: 641-697
- Cheung, C., G. Zheng, A. Li, B. Richardson y P. Lam, 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquatic Toxicology*, 52: 189-203.
- Coimbra, R., M. da Costa, S.R. da Silva Reis y J.Z. Sandrini, 2012. Molecular and biochemical biomarkers responses in the mussel *Mytilus edulis* collected from Southern Brazil coast. *Marine Pollution Bulletin*, 64, 766-771.
- Comoglio, L., O. Amin, S. Botte y J. Marcovecchio, 2011. Use of biomarkers in resident organisms as a tool for environmental monitoring in a cold coastal system, Tierra del Fuego Island. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 382-393.
- Cortés-Gómez, A.A., G. Fuentes-Mascorro y D. Romero, 2014. Metals and metalloids in whole blood and tissues of Olive Ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) from La Escobilla Beach (Oaxaca, Mexico). *Marine Pollution Bulletin*, 89(1-2): 367-375.
- Cortés-Gómez, A.A., A. Tvarijonavičiute, M. Teles, R. Cuenca, G. Fuentes-Mascorro y D. Romero, 2017. p-Nitrophenyl Acetate Esterase Activity and Cortisol as Biomarkers of Metal Pollution in Blood of Olive Ridley Turtles (*Lepidochelys olivacea*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 75(1): 25-36.
- Cortés-Gómez, A.A., P. Morcillo, F.A. Guardiola, C. Espinosa, M.A. Esteban, A. Cuesta, M. Girondot y D. Romero, 2018. Molecular oxidative stress markers in olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) and their relation to metal concentrations in wild populations. *Environmental Pollution*, 233: 156-167.
- Dalzochio, T., G.Z. Prado, I.E. Petry, G. Gehlen y L. Basso da Silva, 2016. The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. *International Aquatic Research*, 8(4): 283-298.
- Davanzo, M.B., L.B. Moreira, M.F. Pimentel, L.V. Costa-Lo tufo y D.M. de Souza Abessa, 2013. Biomarkers in mangrove root crab *Goniopsis cruentata* for evaluating quality of tropical estuaries. *Marine Environmental Research*, 91: 80-88.
- de Oliveira, C.A., A. Katsumiti, P. França, J. Maschio, E. Zandoná, M.M. Cestari, T. Vicari, H. Roche, H.C. Silva de Assis y F.F. Neto. 2013. Biomarkers responses in fish (*Atherinella brasiliensis*) of Paranaguá Bay, southern Brazil, for assessment of pollutant effects. *Brazilian Journal of Oceanography*, 61(1):1-11.
- de Souza Azevedo, J., E. de Santis y C.A. Oliveira, 2012. Nuclear abnormalities in erythrocytes and morphometric indexes in the catfish *Cathorops spixii* (Ariidae) from different sites on the southeastern Brazilian coast. *Brazilian Journal of Oceanography*, 60(3): 323-330.
- Douben, P.E., 2003. PAHs: An Ecotoxicological Perspective. John Wiley & Sons, England.
- Duarte, C.A., E. Giarratano, O.A. Amin y L.I. Comoglio, 2011. Heavy metal concentrations and biomarkers of oxidative stress in native mussels (*Mytilus edulis chilensis*) from Beagle Channel coast (Tierra del Fuego, Argentina). *Marine Pollution Bulletin*, 62: 1895-1904.
- Flammarion, P., P. Noury y J. Garric, 2002. The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. *Environ. Pollut.*, 120: 325-330.
- Fossi, M.C., M. Baini, C. Panti, M. Galli, B. Jiménez, J. Muñoz-Arnanz, L. Marsili, M. Grazia y D. Ramírez-Macías, 2017. Are whale sharks exposed to persistent organic pollutants and plastic pollution in the Gulf of California (Mexico)? First ecotoxicological investigation using skin biopsies. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 199: 48-58.
- Giarratano, E., M.N. Gil y G. Malanga, 2014. Biomarkers of environmental stress in gills of ribbed mussel *Aulacomya atra atra* (Nuevo Gulf, Northern Patagonia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107: 111-119.
- Gold-Bouchot, G., J. Rubio-Piña, J. Montero-Muñoz, N. Ramirez-Miss, A. Echeverría-García, V. Patiño-Suarez, C.A. Puch-Haub y O. Zapata-Pérez, 2017. Pollutants and biomarker responses in two reef fish species (*Haemulon aurolineatum* and *Ocyurus chrysurus*) in the Southern Gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 116 (1-2): 249-257.
- González, A.C., A. Vallarino, J.C. Pérez y A.M. Low, 2014. Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro ambiental. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) e Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), México. 779 p.
- Gutiérrez, J.M., S. Villar y A. Acuña, 2015. Micronucleus test in fishes as indicators of environmental quality in subestuaries of the Río de la Plata (Uruguay). *Marine Pollution Bulletin*, 91: 518-523.
- Hook, S.E., E.P. Gallagher y G.E. Batley, 2014. The Role of Biomarkers in the Assessment of Aquatic Ecosystem Health. *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 10(3): 327-341.
- Katsumiti, A., F.X. Valdez, M. Azevedo, M.D. da Silva, R.C. Damian, M.I.M. Almeida, H.C. Silva de Assis, M.M. Cestari, M.A.F. Randi, C.A. Oliveira y C.A. Freire, 2009. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña Oil Spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. *Environ. Monit. Assess.*, 152: 209-222.
- Kirschbaum, A.A., R. Seriani, C.D.S. Pereira, A. Assunção, D.M. de Souza Abessa, M.M. Rotundo y M.J.T. Ranzani-Paiva, 2009. Cytogenotoxicity biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vi-



- cente estuaries, SP, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 32(1): 151-154.
- Kroon, F., C. Streten y S. Harries, 2017. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. *PLoS One*, 12(4):e0174762.
- Labrada-Martagón, V., P.A. Tenorio, L.C. Méndez-Rodríguez y T. Zenteno-Savín, 2011. Oxidative stress indicators and chemical contaminants in East Pacific green turtles (*Chelonia mydas*) inhabiting two foraging coastal lagoons in the Baja California peninsula. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* (154): 65-75.
- Laitano, M.V. y A.V. Fernández-Gimenez, 2016. Are Mussels Always the Best Bioindicators? Comparative Study on Biochemical Responses of Three Marine Invertebrate Species to Chronic Port Pollution. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 97: 50-55.
- Lavradas, R.T., R.C.C. Rocha, I.C.A.C. Bordon, T.D. Saint' Pierre, J.M. Godoy y R.A. Hauser-Davis, 2016. Differential metallothionein, reduced glutathione and metal levels in *Perna perna* mussels in two environmentally impacted tropical bays in south eastern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 129: 75-84.
- Leonardi, M., E. Tarifeño y J. Vera, 2009. Diseases of the Chilean Flounder, *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867), as a Biomarker of Marine Coastal Pollution Near the Itata River (Chile): Part II. Histopathological Lesions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56: 546-556.
- Lezcano, A.H., M.L. Rojas, A.L. Liberoff y S. Van der Molen, 2015. Marine pollution effects on the southern surf crab *Ovalipes trimaculatus* (Crustacea: Brachyura: Polybiidae) in Patagonia Argentina. *Marine Pollution Bulletin*, 91: 524-529.
- Lionetto, M.G., R. Caricato y M.E. Giordano, 2019. Pollution Biomarkers in Environmental and Human Biomonitoring. *The Open Biomarkers Journal*, 9(1):1-9.
- Livingstone, D.R., 1993. Biotechnology and Pollution Monitoring: Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 57: 195-211.
- Logan, D.T., 2007. Perspective on ecotoxicology of PAHs to fish. *Human and Ecological Risk Assessment*, 13(2): 302-316.
- Machado-Schiaffino, G., L.O. Bala y E. Garcia-Vazquez, 2009. Recovery of Normal Cytogenetic Records in Mussels After Cessation of Pollutant Effluents in Puerto Madryn (Patagonia, Argentina). *Estuaries and Coasts*, 32:813-818.
- Márquez, F., M.A. Primost y G. Bigatti, 2017. Shell shape as a biomarker of marine pollution historic increase. *Marine Pollution Bulletin*, 114: 816-820.
- Monserrat, J.M., P. E. Martínez, L.A. Geracitano, L.L. Amado, C.M.G. Martins, G.L. Leães, I. Soares, M. Ferreira-Cravo, J. Ventura-Lima y A. Bianchini, 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 146:221-234.
- Morado, C.N., F.G. Araújo y I.D. Gomes, 2017. The use of biomarkers for assessing effects of pollutant stress on fish species from a tropical river in Southeastern Brazil. *Acta Scientiarum, Biological Sciences*, 39(4): 431-439.
- Nincao, F., D.C. Maciel, S. Mendonça de Almeida, D.M. Abessa, L.A. Maranhão, C. S. Pereira, G. Takeshi, E. Zanardi-Lamardo y I. Braga, 2017. Shell alterations in limpets as putative biomarkers for multi-impacted coastal areas. *Environmental Pollution*, 226: 494e503.
- Pampanin, D.M. y M.O. Sydnes, 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons a constituent of petroleum: Presence and influence in the aquatic environment. p. 83-118. In: V. Kutcherov y A. Kolesnikov (eds.). *Hydrocarbon. InterOpen*.
- Pereira, T., E. Teixeira, R. Jurema, R. Tortelly y L. Gatti, 2009. Mercury level and histopathologic analysis of muscle, kidney and brain of largehead hairtail (*Trichiurus lepturus*) collected in Itaipu beach, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. *Ciência Rural*, 39(2), 540-546.
- Perrault, J.R., J.R. Schmid, C.J. Walsh, J.E. Yordy y A.D. Tucker, 2014. Brevetoxin exposure, superoxide dismutase activity and plasma protein electrophoretic profiles in wild-caught Kemp's ridley sea turtles (*Lepidochelys kempi*) in southwest Florida. *Harmful Algae*, 37: 194-202.
- Perrault, J.R., N.I. Stacy, A.F. Lehner, S.K. Poor, J.P. Buchweitz y C.J. Walsh, 2017. Toxic elements and associations with hematology, plasma biochemistry, and protein electrophoresis in nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from Casey Key, Florida. *Environmental Pollution*, 231(Pt 2): 1398-1411.
- Potters, G., 2013. *Marine Pollution*, 1st ed. Bookboon.com.
- Recabarren-Villalón, T., A.C. Ronda y A.H. Arias, 2019. Polycyclic aromatic hydrocarbons levels and potential biomarkers in a native South American marine fish. *Regional Studies in Marine Science*, 29: 100695.
- Reddy, P.B. y S.S. Rawat, 2013. Assessment of Aquatic Pollution Using Histopathology in Fish as a Protocol. *International Research Journal of Environment Sciences*, 2(8): 79-82.
- Richardson, B. J., E. Mak, S.B. De Luca-Abbott, M. Martin, K. McClellan y P.K.S. Lam, 2008. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels "integrate" biomarker responses?. *Marine Pollution Bulletin*, 57(6-12), 503-514.
- Ronda, A.C., A.L. Oliva, A.H. Arias, M.M. Orazi y J.E. Marcovecchio, 2018. Biomarker Responses to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Native Fish *Ramnogaster arcuata*, South America. *International Journal of Environmental Research*, 13(1): 77-89.
- Rousselet, E., M. Levin, E. Gebhard, B.M. Higgins, S. DeGuise y C.A.J. Godard-Codding, 2017. Polychlorinated biphenyls (BPCs) modulate both phagocytosis and NK cell activity in vitro in juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80(10-12): 556-561.



- Salvarani, P.I., L.R. Vieira, W. Ku-Peralta, F. Morgado y J. Rendón-von Osten, 2018. Oxidative stress biomarkers and organochlorine pesticides in nesting female hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata* from Mexican coast (Punta Xen, Mexico). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(24): 23809-23816.
- Samanta, P., S. Pal, A.K. Mukherjee, T. Senapati y A.R. Ghosh, 2014a. Effects of Almix herbicide on metabolic enzymes in different tissues of three teleostean fishes *Anabas testudineus*, *Heteropneustes fossilis* and *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences*, 2: 156-163.
- Samanta, P., S. Pal, A.K. Mukherjee, T. Senapati, D. Kole y A.R. Ghosh, 2014b. Effects of almix herbicide on profile of digestive enzymes of three freshwater teleostean fishes in rice field condition. *Toxicology Reports*, 1: 379-384.
- Sarkar, A., D. Ray, A.N. Shrivastava y S. Sarker, 2006. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*, 15: 333-340.
- Seriani, R., L. Buruaem, D. Moledo, L.D. Abujamara, N.S.B. de Carvalho, L. Alves, A.A. Kirschbaum y M.J.T. Ranzani-Paiva, 2010. Hematological analysis of *Micropogonias furnieri*, DESMAREST, 1823, Scianidae, from two estuaries of Baixada Santista, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, 58 (special issue iv sob): 87-92.
- Setim, F.E., V.C. de Oliveira, M. Ramos, R. Gioia-Di Chiacchio, F. Barbosa y E. Reiko, 2015. Chemical Element Concentrations in the Blood of Green Turtles (*Chelonia mydas*) Captured at Fernando De Noronha Marine National Park, Brazil. *Journal of Environmental and Analytical Toxicology*, 5(6): 1000325.
- Siddig, A.A.H., A.M. Ellison, A. Ochs, C. Villar-Leeman y M.K. Lau, 2016. How do ecologists select and use indicator species to monitor ecological change? Insights from 14 years of publication in Ecological Indicators. *Ecological Indicators*, 60: 223-230.
- Souza-Bastos, L.R. y C.A. Freire, 2011. Osmoregulation of the resident estuarine fish *Atherinella brasiliensis* was still affected by an oil spill (Vicuña tanker, Paranaguá Bay, Brazil), 7 months after the accident. *Science of the Total Environment*, 409: 1229-1234.
- Souza, I.C., I.D. Duarte, N.Q. Pimentel, L.D. Rocha, M. Morozesk, M.M. Bonomo, V.C. Azevedo, C.D.S. Pereira, M.V. Monferrán, C.R.D. Milanez, S.T. Matsumoto, DA. Wunderlin y M.N. Fernandes, 2013. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. *Environmental Pollution*, 180: 136e144.
- Tavares, D., M.G. Paulino, A.P. Terezan, J.B. Fernandes, A. Giani, M.N. Fernandes, 2018. Biochemical and morphological biomarkers of the liver damage in the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*, injected with crude extract of cyanobacterium *Radiocystis fernandoi*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(16): 15349-15356.
- Tkachenko, H., N. Kurhaluk, y J. Grudniewska, 2013. Effects of chloramine-T exposure on oxidative stress biomarkers and liver biochemistry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), brown trout, *Salmo trutta* (L.), and grayling, *Thymallus thymallus* (L.). *Archives of Polish Fisheries*, 21(1).
- Toro-Restrepo, B., 2011. Uso de los biomarcadores en la evaluación de la contaminación. *Luna Azul*, 32: 121-127.
- Tremblay, N., A. Ortíz, M. González y J. Rendón-von Osten, 2016. Relationship between organochlorine pesticides and stress indicators in hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting at Punta Xen (Campeche), Southern Gulf of Mexico. *Ecotoxicology*, 26(2): 173-183.
- Valavanidis, A., T. Vlahogiannia, M. Dassenakish y M. Scoullou, 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64: 178-189.
- van der Oost, R., J. Beyer y N.P.E. Vermeulen, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57149.
- Yancheva, V., I. Velcheva, S. Stoyanova y E. Georgieva, 2015. Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review. *Applied Ecology and Environmental Research*, 14(1): 47-75.
- Yancheva, V.S., S.G. Stoyanova, E.S. Georgieva y L.G. Velcheva, 2018. Mussels in Ecotoxicological Studies - Are They Better Indicators for Water Pollution Than Fish?. *Ecologia Balkanica*, 10(1): 57-84.
- Zapata, M., M. Lang, R. Riso, D. Moraga y C. Riquelme, 2012. Trace metal and biomarker levels in tissues of *Argopecten purpuratus* in the north of Chile, and the potential use of this species as a bioindicator of metallic stress. *Aquatic Living Resources*, 25: 259-267.
- Zapata-Vívenes, E., L. Rojas de Astudillo, G. Sánchez y M. Barreto, 2012. Metales pesados y biomarcadores relacionados en *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) recolectado en las costas del estado Sucre, Venezuela. *Ciencias Marinas*, 38(3): 517-528.