

Tesis Doctoral

Biomarcadores de contaminación de teleósteos dulceacuícolas como herramienta de evaluación de ambientes acuáticos afectados por compuestos orgánicos persistentes

Scarcia, Paola Inés

2014-03-12

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Scarcia, Paola Inés. (2014-03-12). Biomarcadores de contaminación de teleósteos dulceacuícolas como herramienta de evaluación de ambientes acuáticos afectados por compuestos orgánicos persistentes. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Scarcia, Paola Inés. "Biomarcadores de contaminación de teleósteos dulceacuícolas como herramienta de evaluación de ambientes acuáticos afectados por compuestos orgánicos persistentes". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-03-12.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Biomarcadores de contaminación de teleósteos dulceacuícolas
como herramienta de evaluación de ambientes acuáticos
afectados por compuestos orgánicos persistentes**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Paola Inés Scarcia

Director de Tesis: Dr. Fernando Román de la Torre

Consejero de estudios: Dra. Graciela Esnal

Lugar de trabajo: Laboratorio del Programa de Ecofisiología Aplicada. Dpto. de
Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján.

Buenos Aires, 2013.

BIOMARCADORES DE CONTAMINACIÓN DE TELEÓSTEOS DULCEACUÍCOLAS COMO HERRAMIENTA DE EVALUACIÓN DE AMBIENTES ACUÁTICOS AFECTADOS POR COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES

RESUMEN

En el presente trabajo de tesis se evaluó la respuesta de una batería de parámetros biomarcadores fisiológicos, bioquímicos y moleculares en teleósteos dulceacuícolas, útiles y aplicables en la evaluación de la calidad de cuerpos de agua afectados por compuestos orgánicos persistentes (COPs) de origen antrópico. Se evaluaron biomarcadores de contaminación asociados a la biotransformación (actividad enzimática de glutatión-S-transferasa, inmunodetección de la proteína CYP1A y la actividad catalítica de la EROD, niveles de metabolitos biliares); al estrés oxidativo (actividad enzimática de la catalasa, superóxido dismutasa y niveles de TBARS) y asociado a la presencia de desorganizadores endócrinos (inmunodetección de vitelogenina plasmática). También se determinaron los índices fisiológicos factor de condición e índice hepatosomático. Se utilizaron como organismos prueba ejemplares juveniles de *Cyprinus carpio* y de diferentes especies nativas frecuentadoras de fondo. Se evaluaron los efectos adversos por exposición de dichas especies a diferentes tipos de COPs (hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados y compuestos con efecto desorganizador endócrino) por medio de ensayos de laboratorio y mediante evaluaciones a campo por exposición en jaulas (Río de la Plata y río Luján) y de recolección de especies nativas. Los resultados obtenidos permitieron caracterizar y comparar el efecto de los diferentes COPs sobre las respuestas de los biomarcadores en las especies prueba. Se demostró que el confinamiento de peces en jaulas es una metodología de trabajo útil en la evaluación de la calidad ecotoxicológica de ríos periurbanos. Se utilizaron técnicas que permitieron realizar un análisis de los resultados comparando e integrando las respuestas de los biomarcadores en los ensayos de laboratorio y de campo *in situ*. Se elaboró una línea de base para cada parámetro biomarcador y se proporcionó información de referencia sobre la variabilidad natural de los mismos que puede ser empleada en futuros ensayos de laboratorio y de evaluación de ambientes acuáticos afectados por COPs.

Palabras claves: contaminación acuática, biomarcadores de contaminación, teleósteos dulceacuícolas, especies nativas, compuestos orgánicos persistentes, Río de la Plata, río Luján.

BIOMARKERS OF CONTAMINATION OF FRESHWATER TELEOSTS AS AN ASSESSMENT TOOL IN AQUATIC ENVIRONMENTS AFFECTED BY PERSISTENT ORGANIC COMPOUNDS

ABSTRACT

In this thesis we evaluated the response of a battery of physiological, biochemical and molecular biomarkers of freshwater teleost, useful and relevant in the evaluation of the quality of water bodies affected by anthropogenic inputs of persistent organic compounds (POCs). Biomarkers of contamination associated with biotransformation (enzymatic activity of glutathione-s transferase, immunodetection of CYP1A protein and catalytic activity of EROD, biliary metabolites levels), oxidative stress (enzymatic activity of catalase and superoxide dismutase, TBARS levels) and endocrine disruption (immunodetection of vitellogenin plasmatic protein) were assessed. Physiological indices, condition factor and liver somatic index were also assessed. *Cyprinus carpio* and bottom dweller native species juveniles were used as test organisms. Adverse effects were assessed by exposing those species to different kind of POCs (polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and endocrine-disrupting chemicals) by means of laboratory and field evaluations by cage exposure (Rio de la Plata and Luján river) and native collected fish. Results allowed comparing and characterizing the effect of different POCs on the responses of biomarkers in the test species. Fish exposure in cages proved to be a useful ecotoxicological methodology when evaluating the condition of periurbans rivers. An integrated analysis of the results allowed comparing laboratory assays and field *in situ* biomarker responses of test species. A baseline for each biomarker was developed and reference information was provided about their natural variability that can be used in future laboratory tests and in the assessment of aquatic environments affected by POCs.

Keywords: aquatic contamination, biomarkers of contamination, freshwater teleosts, native species, persistent organic compounds, Río de la Plata, Luján river.

Agradecimientos

Al CONICET y a la Universidad Nacional de Luján por las becas tipo I, II y de formación superior que me brindaron el sustento económico para poder dedicarme 100% al desarrollo de este trabajo de Tesis.

A la FCEyN de la UBA por haberme formado tanto en mi carrera de grado como de Doctorado, por permitirme acceder al excelente nivel educativo de esta Casa de Estudio.

A Fer, mi Director de Tesis y becas, por confiar en mí desde el principio y acompañarme en este largo camino del doctorado. Por todas sus enseñanzas, consejos, oportunidades y paciencia durante estos años. Por ser también mi compañero de muestreo, por ayudarme a pasar la red, remar, procesar los peces hasta altas horas, etc. Por todas las actividades extra compartidas, congresos y viajes anexos. Por estar siempre, en las buenas y en las malas...y fundamentalmente por no dejar que...”nos coman los bichos!”

A Gaby, mi Codirectora de todas las becas, por enseñarme todo lo que sé sobre técnicas moleculares, por darme un lugar en su laboratorio para desarrollar las mismas y ayudarme a que hoy pueda implementarlas en el laboratorio del PRODEA. Por estar siempre presente, por todo el apoyo, empuje y no dejarme bajar los brazos en los momentos difíciles (laborales y personales). Por creer en mí y ser una guía junto con Fer, que equipo eh!

A la Universidad Nacional de Luján, por abrirme las puertas y brindarme el lugar y equipamiento necesario para realizar esta Tesis.

A la ANCyPT, CONICET y al Departamento de Ciencias Básicas de la UNLu por los subsidios otorgados que posibilitaron el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Stella Campo y la Dra. Fabiana Lo Nostro (Fabi) por ayudarme a reinsertarme en la ciencia y ponerme en contacto por primera vez con Fer (allá por el 2005), sin su buena voluntad y predisposición hoy no estaría escribiendo esta sección tan linda de la Tesis.

A la Dra. Lucrecia Ferrari por abrirme las puertas del laboratorio del Programa de Ecofisiología Aplicada (PRODEA) y permitir que sea mi lugar de trabajo.

A mis compañeros del PRODEA, los que están y los que estuvieron durante el desarrollo de esta Tesis: Alfredo Salibián, Lucrecia Ferrari, Adonis Giorgi, Patricia Castañé, Martina Mastrángelo (gracias por el apoyo químico!), Betty Eissa, Naty Ossana y Ana Giusto (gracias por ser durante mucho tiempo compañeras y amigas de mesada, campo, docencia y compartir el largo camino a Luján, por las charlas, consejos y apoyo científico y personal!) a Caro Vilches y Caro II (por compartir muestreos, filtros y lugar en la casita!) a Lau Rigacci (gracias por tooodoo el apoyo estadístico e informático!) a Martín Da Silva (gracias Martincho por la ayuda en el campo y por haberme sacado las papas del fuego en varias

oportunidades!). A todos y cada uno muchas gracias por las horas de trabajo compartidas, mates, tortas de cumple, asados, locros y por hacer del PRODEA un lugar ameno de trabajo.

Al Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar por permitirme realizar gran parte de este trabajo de Tesis. Al grupo de Grupo de Virus Animal, por permitir que su laboratorio sea mi segundo lugar de trabajo y por hacer que me sienta parte del mismo. A Gaby, Guido, Flavia, Paula, Mimi, Esteban, por compartir las mesadas, material de trabajo, lugar en los freezers y responder todaaaasss mis preguntas, por la paciencia y hacerme sentir parte de ustedes. A Majo, por todas las soluciones preparadas, a Silvio por inyectar y sangrar los ratones. A todos muchas gracias!

A los laboratorios que colaboraron para poder realizar las determinaciones de los diferentes COPs analizados en distintas matrices a lo largo de este trabajo: al Laboratorio de Microcontaminantes Acuáticos de la Universidad Federal de Rio Grande (FURG), Brasil, en particular al Dr. Gilberto Fillmann y la Dra. Patricia Costa; al Laboratorio del centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIMA), Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, en especial al Dr. Pedro Carriquiriborde y al Dr. Damián Marino; al Laboratorio de Ecotoxicología de la Universidad Nacional de Mar del Plata, particularmente a la Dra. Karina Miglioranza, Dra. Mariana González y Dra. Paola Ondarza.

A la Dra. Graciela Esnal por su apoyo como consejera de estudios.

A los compañeros de otros laboratorios de la UNLu, en especial a la gente de Ecología por compartir su laboratorio y material necesario para los muestreos; en particular a Nadia Codugnello por ser una excelente compañera, por compartir muestreos, trabajo de mesada, congresos etc., espero podamos seguir trabajando juntas. A la gente de química, en particular a Andrés Piguín por su ayuda en mis comienzos con la fluorimetría.

A todos los pasantes que colaboraron en este trabajo, en tareas de campo y laboratorio: Rocío del Pilar Luque, Juan Pablo Ferro, Sebastián Sheehan, Germán Tamagni, Lucía Oliva Martín y Laureano Loch.

Al personal no docente de la UNLu, a los técnicos del Laboratorio Central en especial Andrés, Cacho, Gustavo, Claudia, Victor y Eugenia. A Fabiana, Eda, Sebastián y Emiliano por su colaboración en las tareas de limpieza diaria en el laboratorio, gracias por lavarme tantos tubitos!

Al Sr. Adrián Espósito, Director de Turismo de Ensenada por permitirme el ingreso al muelle de Punta Lara y al Sr. Victor Carrizo, guardavidas de Punta Lara por su colaboración en los muestreos realizados desde el muelle.

A los pescadores de Punta Lara, por su predisposición y ayuda brindada para colocar las jaulas en el Río de la Plata.

A mis amigos científicos Ce, Naty F, Marian, Adri, Vir, Lore, Die, Ari, a mis amigas superpoderosas Anita y Marita, a los que están más lejos, Naty G. y Sari, a los no científicos Ann, Bel, Gise a todos gracias por ser parte de mi vida, por compartir los buenos y malos momentos.

A mi familia, por acompañarme y apoyarme siempre desde el comienzo de mi carrera en la biología. Gracias Ma y Pa por TODO lo que me dieron en la vida y por estar siempre presentes. A mis hermanas del alma Flori y Gise por ser además compañeras y amigas, por escucharme y alentarme, gracias miles! Al “enano”, Eze mi hermanito mas peque, que aunque siempre dijo que no iba a estudiar lo mismo que yo, le pegaste en el palo...casi veterinario! A mis cuñados Charlie y Vivi, obvio!

A mi nueva familia, aunque ya no tan nueva, por acompañarme y alentarme casi desde el comienzo en la biología. A Graciela y Gildo por ser como mis papás, a Ger y Bachu, mis hermanos adoptivos por estar siempre, a mis cuñados Esteban y Marina y por supuesto a Juli, mi sobri que aunque no lo sepa me da fuerza para seguir adelante.

A Gon, por bancarme siempre desde que decidí ser bióloga, por acompañarme en todo momento, por alentarme para seguir adelante en los momentos no tan buenos, por ayudarme a pensar siempre en positivo, por acompañarme a Luján a buscar y darle de comer a los peces, por ayudarme a confeccionar las jaulas, por la paciencia, por confiar en mí y no dudar nunca que lo lograría. Gracias por darle sentido a mi vida!

Finalmente, citando al Dr. de la Torre gracias a los ejemplares de C. carpio y el resto de los peces que prestaron involuntariamente su apoyo, ya que sin ellos no hubiera sido posible realizar este trabajo.

A todos y a cada uno, gracias, gracias, muchas gracias!

ÍNDICE

Página

Resumen	I
Abstract	II
Agradecimientos	III
Índice de Figuras	X
Índice de Tablas	XIV
Abreviaturas	XVI

CAPÍTULO 1: Introducción General

1.1 La ecotoxicología.....	2
1.2 La contaminación del ambiente acuático.....	2
1.3 Toxicidad y efectos de los compuestos orgánicos persistentes.....	4
1.4 Cuerpos de agua de la provincia de Buenos Aires afectados por la contaminación antrópica.....	6
1.5 Biomarcadores de contaminación.....	9
1.6 Los peces como organismos prueba.....	14
1.7 Bioensayos de laboratorio y de campo.....	15

CAPÍTULO 2: Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis general.....	20
2.2 Objetivo general.....	20
2.3 Objetivos específicos.....	20
Esquema-resumen general de la Tesis.....	22

CAPÍTULO 3: Metodología General

3.1 Organismos prueba.....	24
3.2 Diseños experimentales.....	29
3.2.1 Bioensayos de laboratorio.....	30
3.2.2 Bioensayos de campo.....	37
3.3 Preparación de las muestras biológicas.....	40
3.4 Parámetros biomarcadores.....	42
3.4.1 Índices fisiológicos.....	42
3.4.2 Asociados a biotransformación.....	42
3.4.3 Asociados a estrés oxidativo.....	45
3.4.4 Asociados a la presencia de desorganizadores endócrinos.....	47
3.5 Parámetros fisicoquímicos y determinaciones de COPs en sedimento.....	49
3.6 Análisis estadístico.....	52

CAPÍTULO 4: Efecto de hidrocarburos aromáticos policíclicos sobre las respuestas de biomarcadores de las especies prueba: exposición en diferentes matrices.

4.1 Introducción.....	56
4.1.1 Hipótesis y Objetivos.....	59
4.2 Materiales y Métodos.....	60
4.2.1 Bioensayos de intoxicación con HAPs.....	60
4.2.1.1 Inyección intraperitoneal.....	60
4.2.1.2 Exposición en agua.....	60
4.2.1.3 Exposición a sedimento fortificado.....	61
4.2.2 Parámetros evaluados.....	62
4.2.2.1 Parámetros biomarcadores.....	62
4.2.2.2 Parámetros fisicoquímicos y determinación de HAPs en sedimento.....	62
4.2.3 Análisis estadístico.....	63
4.3 Resultados.....	63
4.3.1 Inyección intraperitoneal.....	63
4.3.2 Exposición en agua.....	68
4.3.3 Exposición a sedimento fortificado.....	73
4.3.4 Parámetros fisicoquímicos y determinación de HAPs en sedimento..	76
4.4 Discusión.....	81

CAPÍTULO 5: Efecto de compuestos desorganizadores endócrinos sobre las respuestas de los biomarcadores.

5.1 Introducción.....	90
5.1.1 Hipótesis y Objetivos.....	94
5.2 Materiales y Métodos.....	94
5.2.1 Bioensayos de intoxicación inducida.....	94
5.2.2 Exposición a sedimentos fortificados con nonilfenol.....	95
5.2.3 Parámetros evaluados.....	96
5.2.3.1 Parámetros biomarcadores.....	96
5.2.3.2 Parámetros fisicoquímicos y determinación de NP en sedimento...	96
5.2.4 Análisis estadístico.....	97
5.3 Resultados.....	97
5.3.1 Bioensayos de intoxicación inducida.....	97
5.3.2 Exposición a sedimentos fortificados con nonilfenol.....	102
5.3.3 Parámetros fisicoquímicos y determinación de NP en sedimento.....	105
5.4 Discusión.....	106

CAPÍTULO 6: Efecto de los bifenilos policlorados (PCBs) y mezclas de COPs sobre las respuestas de los biomarcadores.

6.1 Introducción.....	112
6.1.1 Hipótesis y Objetivos.....	115
6.2 Materiales y Métodos.....	116
6.2.1 Bioensayos de intoxicación inducida por medio de inyección intraperitoneal con PCB126 y mezclas de COPs.....	116
6.2.2 Exposición a sedimentos fortificados con mezclas de PCBs.....	117
6.2.3 Parámetros evaluados.....	117
6.2.3.1 Parámetros biomarcadores.....	117
6.2.3.2 Parámetros fisicoquímicos y determinación de PCBs en sedimento.....	118
6.2.4 Análisis estadístico.....	119
6.3 Resultados.....	119
6.3.1 Bioensayos de intoxicación inducida por medio de inyección intraperitoneal con PCB126 y mezclas de COPs.....	120
6.3.2 Exposición a sedimentos fortificados con mezclas de PCBs.....	122
6.3.3 Parámetros fisicoquímicos y determinación de PCBs en sedimento..	125
6.4 Discusión.....	129

CAPÍTULO 7: Evaluación de la calidad ambiental de ríos periurbanos mediante respuestas de parámetros biomarcadores de *Cyprinus carpio* y especies nativas.

7.1 Introducción.....	136
7.1.1 Hipótesis y Objetivos.....	139
7.2 Estudios en la zona de Punta Lara (Río de la Plata).....	140
7.2.1 Materiales y Métodos.....	140
7.2.1.1 Área de estudio.....	140
7.2.1.2 Diseño experimental.....	142
7.2.1.3 Parámetros biomarcadores.....	143
7.2.1.4 Parámetros fisicoquímicos y caracterización de sedimentos.....	144
7.2.1.5 Análisis estadístico.....	146
7.2.2 Resultados.....	147
7.3 Estudios en el tramo medio del Río Luján.....	168
7.3.1 Materiales y Métodos.....	168

7.3.1.1 Área de estudio.....	168
7.3.1.2 Diseño experimental.....	168
7.3.1.3 Parámetros biomarcadores.....	170
7.3.1.4 Parámetros fisicoquímicos.....	170
7.3.1.5 Análisis estadístico.....	170
7.3.2 Resultados.....	171
7.5 Discusión.....	178

CAPÍTULO 8: Evaluación de la variabilidad de los biomarcadores.

8.1 Introducción.....	197
8.1.1 Hipótesis y Objetivos.....	197
8.2 Materiales y Métodos.....	198
8.2.1 Variabilidad de los niveles basales de los biomarcadores.....	198
8.2.2 Incidencia de las condiciones ambientales sobre la variabilidad de los biomarcadores.....	199
8.2.3 Análisis estadísticos.....	200
8.3 Resultados.....	200
8.3.1 Variabilidad de los niveles basales de los biomarcadores.....	200
8.4.2 Incidencia de las condiciones ambientales sobre la variabilidad de los biomarcadores.....	207
8.4 Discusión.....	210

CAPÍTULO 9: Discusión general y Conclusiones..... 213

Anexo: Obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína Vtg de <i>C. carpio</i>	224
--	-----

Bibliografía citada	237
----------------------------------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS:

	<i>Página</i>
Figura 1.1 Esquema de las distintas fuentes de ingreso y distribución de los contaminantes en el ecosistema acuático así como las rutas de ingreso y acumulación en peces.....	3
Figura 1.2 Esquema de los mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.....	13
Figura 1.3 Ensayos <i>in situ</i> como nexo entre las condiciones controladas en el laboratorio y el realismo ambiental en ensayos de campo.....	17
Figura 3.1 Esquema de preadaptación. Consideraciones generales tenidas en cuenta durante este período en todos los ensayos.....	30
Figura 3.2 Esquema de los bioensayos de laboratorio por medio de una única inyección intraperitoneal.....	31
Figura 3.3 Esquema del diseño experimental de los bioensayos de laboratorio por exposición de BaP en agua.....	32
Figura 3.4 Esquema del diseño experimental de los bioensayos de laboratorio por exposición a sedimento fortificado con los diferentes tóxicos.....	34
Figura 3.5 Esquema del diseño experimental de los ensayos de exposición a sedimento ambiental (A) tareas de campo y (B) de laboratorio.....	36
Figura 3.6 Mapa de la cuenca del río Luján, río Reconquista y parte del Río de la Plata.....	38
Figura 3.7 Esquema del diseño experimental de los bioensayos de campo (A) <i>in situ</i> , (B) de recolección.....	39
Figura 3.8 Esquema de preparación de las muestras biológicas y parámetros biomarcadores analizados.....	41
Figura 3.9 Esquema de revelado con fosfatasa alcalina.....	49
Figura 4.1 Estructura química de algunos HAPs comúnmente estudiados.....	57
Figura 4.2 Rutas de biotransformación del benzo(a)pireno (BaP).....	58
Figura 4.3 Parámetros bioquímicos de <i>C. carpio</i> y <i>C. paleatus</i> luego de la inyección de una dosis subletal de β -naftoflavona.....	65
Figura 4.4 Inmunodetección por <i>Western blot</i> de la expresión de la proteína CYP1A de <i>C. carpio</i> y la especie nativa <i>C. paleatus</i> luego de 48h de exposición a HAPs por medio de una única inyección intraperitoneal.....	66
Figura 4.5 Parámetros bioquímicos de <i>Cyprinus carpio</i> luego de la inyección de una dosis subletal de benzo(a)pireno.....	67
Figura 4.6 Biomarcadores bioquímicos de <i>C. carpio</i> evaluados luego de la exposición a dos concentraciones de benzo(a)pireno en agua bajo condiciones estándar de laboratorio.....	71

Figura 4.7	Inmunodetección por <i>Western blot</i> de la proteína CYP1A de <i>C. carpio</i> luego de la exposición a BaP en agua y por medio de inyección intraperitoneal.....	72
Figura 4.8	Inmunodetección por <i>Western blot</i> de la proteína CYP1A de <i>P. laticeps</i> luego de la exposición a dos concentraciones de BaP en agua.....	72
Figura 4.9	Biomarcadores bioquímicos de <i>P. laticeps</i> evaluados luego de 7 y 14 días de exposición a dos concentraciones de benzo(a)pireno en agua bajo condiciones estándar de laboratorio.....	73
Figura 4.10	Biomarcadores bioquímicos de <i>C. carpio</i> y <i>H. littorale</i> evaluados luego de la exposición a sedimento fortificado con benzo(a)pireno bajo condiciones estándar de laboratorio.....	75
Figura 4.11	Inmunodetección por <i>Western blot</i> de la expresión de la proteína CYP1A de <i>C. carpio</i> y la especie nativa <i>H. littorale</i> luego de 21 días de exposición a sedimento fortificado con benzo(a)pireno.....	76
Figura 4.12	Composición granulométrica del sedimento de referencia utilizado en los ensayos tipo <i>spiked</i>	77
Figura 4.13	Parámetros biomarcadores (A) de biotransformación y detoxificación (B) y de estrés oxidativo evaluados en <i>C. carpio</i> y las especies nativas luego de la exposición a BaP en las diferentes matrices.....	84
Figura 5.1	Estructura química del 17 β -estradiol y nonilfenol ramificado, esquema de uno de los mecanismos de acción del nonilfenol, la competencia por la unión al receptor de estrógeno con 17 β -estradiol...	92
Figura 5.2	Biomarcadores bioquímicos evaluados luego de una dosis subletal de nonilfenol o 17 β -estradiol en <i>C. carpio</i> (A y B) y <i>P. laticeps</i> (A) bajo condiciones estándar de laboratorio.....	99
Figura 5.3	Inmunodetección por <i>Western blot</i> de la proteína Vtg en plasma de juveniles de <i>C. carpio</i> , luego de 72 h de exposición a: 17 β -estradiol (E2), nonilfenol (NP) o aceite de maíz (Co).....	101
Figura 5.4	Inmunodetección por <i>Dot Blot</i> de la proteína Vtg en ejemplares juveniles de <i>C. carpio</i> y especies nativas, luego de 72 h de exposición a 17 β -estradiol o aceite de maíz.....	101
Figura 5.5	Inmunodetección por <i>Western blot</i> de la proteína Vtg en plasma de juveniles de <i>C. carpio</i> , <i>H. commersoni</i> , <i>C. voga</i> , <i>H. littorale</i> y <i>L. anus</i> , luego de 72 h de exposición a: 17 β -estradiol o aceite de maíz.....	102
Figura 5.6	Biomarcadores bioquímicos de <i>C. carpio</i> y <i>C. paleatus</i> evaluados luego de la exposición a sedimento fortificado con nonilfenol bajo condiciones estándar de laboratorio.....	104

Figura 6.1	Estructura química de los bifenilos policlorados (PCBs) y sistema de sustitución numérica de átomos de cloro.....	112
Figura 6.2	Biomarcadores bioquímicos de <i>C. carpio</i> evaluados luego de una dosis subletal de PCB 126 y mezclas de COPs bajo condiciones estándar de laboratorio.....	121
Figura 6.3	Inmunodetección por <i>Western blot</i> de la expresión de la proteína CYP1A de <i>C. carpio</i> 48h después de la administración de diferentes COPs y mezclas por medio de una única inyección intraperitoneal.....	122
Figura 6.4	Biomarcadores bioquímicos de <i>C. carpio</i> y <i>C. paleatus</i> evaluados luego de la exposición a sedimento fortificado con Aroclor (1254:1260) bajo condiciones estándar de laboratorio.....	124
Figura 6.5	Inmunodetección por <i>Western blot</i> de la expresión de la proteína CYP1A de <i>C. carpio</i> y la especie nativa <i>C. paleatus</i> luego de 21 días de exposición a sedimento fortificado con Aroclor 1254:1260.....	125
Figura 7.1	Imagen satelital de Punta Lara y zonas aledañas. PL 1 y PL 2, puntos donde se llevaron a cabo los ensayos en jaulas durante el 2007 y 2010 respectivamente.....	141
Figura 7.2	Biomarcadores bioquímicos de <i>C. carpio</i> y <i>L. obtusidens</i> evaluados luego de la exposición <i>in situ</i> y recolección de la zona costera de Punta Lara (PL) y sitios de referencia (SR I y SR III).....	149
Figura 7.3	Inmunodetección por <i>Western blot</i> de la proteína CYP1A de <i>C. carpio</i> (A) y <i>L. obtusidens</i> (B).....	150
Figura 7.4	Biomarcadores bioquímicos de <i>C. carpio</i> y <i>P. lineatus</i> evaluados luego de la exposición <i>in situ</i> y recolección de la zona costera de Punta Lara (PL) y sitios de referencia (SR I y SR IV).....	152
Figura 7.5	Inmunodetección por <i>Western blot</i> de la proteína CYP1A de <i>C. carpio</i> luego de la exposición <i>in situ</i> y a sedimentos de Punta Lara y el A° Las Flores como sitio de referencia.....	153
Figura 7.6	Biomarcadores bioquímicos de <i>C. carpio</i> evaluados luego de la exposición a sedimento de Punta Lara bajo condiciones estándar de laboratorio.....	154
Figura 7.7	Composición granulométrica y contenido de materia orgánica del sedimento superficial del A° Las Flores (SR I) y Punta Lara (PL) en los dos períodos de ensayo (2007 y 2010).....	156
Figura 7.8	Análisis discriminante. Segregación de la respuesta integrada de <i>C. carpio</i> utilizando todos los parámetros biomarcadores en función a las distintas condiciones experimentales ensayadas.....	167
Figura 7.9	Imagen satelital del tramo medio del río Luján.....	169

Figura 7.10	Respuestas de biomarcadores bioquímicos de <i>C. carpio</i> luego de 14 días de exposición <i>in situ</i> en dos sitios del río Luján (S1 y S2) y en un sitio de referencia, el A° Durazno (RS II).....	173
Figura 7.11	Inmunodetección por <i>Western blot</i> de la proteína CYP1A de <i>Cyprinus carpio</i> (A) y <i>Pimelodella laticeps</i> (B).....	174
Figura 7.12	Inmunodetección por <i>Western blot</i> de la proteína Vtg de juveniles de <i>Cyprinus carpio</i> (A, B, C) y <i>Pimelodella laticeps</i> (D).....	174
Figura 7.13	Respuestas de biomarcadores bioquímicos de <i>P. laticeps</i> luego de 7 y 14 días de exposición <i>in situ</i> en dos sitios del río Luján (S1 y S2) y en un sitio de referencia, el A° Las Flores (SR I).....	177
Figura 8.1	Línea de base de los parámetros biomarcadores evaluados en <i>C. carpio</i> luego de la exposición a diferentes matrices control.....	204
Figura 8.2	Línea de base de los parámetros biomarcadores evaluados en <i>C. paleatus</i> luego de la exposición a diferentes matrices control.....	205
Figura 8.3	Línea de base de los parámetros biomarcadores evaluados en <i>P. laticeps</i> luego de la exposición a diferentes matrices control.....	206
Figura 8.4	Biomarcadores bioquímicos de <i>C. paleatus</i> evaluados en condiciones de laboratorio y campo durante el período estival e invernal.....	209
Figura 9.1	Respuesta integrada (IBR) y gráficos estrella de los biomarcadores evaluados en condiciones de laboratorio.....	216
Figura 9.2	Respuesta integrada (IBR) y gráfico estrella de los biomarcadores evaluados en condiciones de campo.....	217
Figura 9.3	Respuesta integrada (IBR) y gráfico estrella de los biomarcadores evaluados en Punta Lara y sitios de referencia en condiciones de campo y laboratorio.....	219
Figura I	Evaluación de la expresión de las proteínas Vtg recombinantes.....	226
Figura II	Gráfico de hidrofiliidad. Hopp and Woods.....	227
Figura III	Secuencia aminoacídica de la proteína recombinante Vtg-B y porcentaje de identidad aminoacídica con las proteínas Vtg de ciprínidos y salmónidos.....	228
Figura IV	Expresión de Vtg-B a distintos tiempos post inducción.....	229
Figura V	Análisis de la solubilidad de la proteína Vtg-B recombinante.....	230
Figura VI	Purificación del fragmento Vtg-B por columna de Ni-NTA.....	232
Figura VII	Esquema de inmunización de ratones.....	233
Figura VIII	<i>Western blot</i> de los sueros anti Vtg-B de ratones inmunizados con la proteína recombinante del fragmento Vtg-B purificado.....	234
Figura IX	Análisis por <i>Western blot</i> de Vtg en plasma de juveniles de <i>C. carpio</i> ..	235
Figura X	Análisis por <i>Western blot</i> de Vtg en plasma de juveniles de <i>C. carpio</i> en condiciones de campo.....	236

ÍNDICE DE TABLAS:

	<i>Página</i>
Tabla 4.1 Índices fisiológicos de <i>Cyprinus carpio</i> y <i>Corydoras paleatus</i> luego de la inyección de una dosis subletal de BNF en condiciones estándar de laboratorio.....	64
Tabla 4.2 Índices fisiológicos de <i>Cyprinus carpio</i> luego de la inyección de una dosis subletal de BaP en condiciones estándar de laboratorio.....	67
Tabla 4.3 Índices fisiológicos de <i>Cyprinus carpio</i> luego de 14 días de exposición a dos concentraciones subletales de BaP disuelto en agua bajo condiciones estándar de laboratorio.....	70
Tabla 4.4 Índices fisiológicos de <i>Pimelodella laticeps</i> luego 7 y 14 días de exposición a dos concentraciones subletales de BaP disuelto en agua bajo condiciones estándar de laboratorio.....	70
Tabla 4.5 Índices fisiológicos de <i>Cyprinus carpio</i> y <i>Hoplosternum littorale</i> luego de 21 días de exposición a sedimento fortificado con BaP en condiciones de laboratorio.....	74
Tabla 4.6 Parámetros fisicoquímicos determinados en diferentes ensayos en agua..	77
Tabla 4.7 Caracterización de HAPs del sedimento del A° Las Flores utilizado en los ensayos tipo <i>spiked</i>	78
Tabla 4.8 Parámetros fisicoquímicos del agua de los acuarios de ensayos de exposición con sedimento fortificado con BaP.....	80
Tabla 4.9 Concentraciones medias efectivas y cantidades de BaP presentes en los distintos sistemas experimentales.....	80
Tabla 5.1 Índices fisiológicos de <i>Cyprinus carpio</i> y <i>Pimelodella laticeps</i> luego de la administración de una dosis subletal de NP o E2 en condiciones estándar de laboratorio.....	98
Tabla 5.2 Índices fisiológicos de <i>Cyprinus carpio</i> y <i>Corydoras paleatus</i> luego de 21 días de exposición a sedimento fortificado con nonilfenol en condiciones estándar de laboratorio.....	103
Tabla 5.3 Parámetros fisicoquímicos del agua de los acuarios de ensayos de exposición con sedimento fortificado con NP.....	105
Tabla 6.1 Índices fisiológicos de <i>Cyprinus carpio</i> luego de la inyección de una dosis subletal de PCB y mezcla de COPs en condiciones estándar de laboratorio.....	120
Tabla 6.2 Índices fisiológicos de <i>Cyprinus carpio</i> y <i>Corydoras paleatus</i> luego de 21 días de exposición a sedimento fortificado con Aroclor (1254:1260) en condiciones estándar de laboratorio.....	123
Tabla 6.3 Caracterización de PCBs del sedimento del A° Las Flores utilizado en los ensayos tipo <i>spiked</i> antes y después del fortificado; composición del Aroclor®1254 y 1260.....	126

Tabla 6.4	Parámetros fisicoquímicos del agua de los acuarios de ensayos de exposición con sedimento fortificado con Aroclor 1254:1260.....	127
Tabla 6.5	Concentraciones medias efectivas y cantidad de PCBs totales presentes en los distintos sistemas experimentales.....	129
Tabla 7.1	Índices fisiológicos de <i>Cyprinus carpio</i> y <i>Leporinus obtusidens</i> luego de la exposición <i>in situ</i> y de la recolección en Punta Lara y sitios de referencia respectivamente, durante el 2007.....	147
Tabla 7.2	Índices fisiológicos de <i>Cyprinus carpio</i> y <i>Prochilodus lineatus</i> luego de la exposición <i>in situ</i> y de la recolección en Punta Lara y sitios de referencia respectivamente, durante el 2010.....	151
Tabla 7.3	Índices fisiológicos de <i>C. carpio</i> luego de 21 días de exposición a sedimento superficial de Punta Lara y el A° Las Flores en condiciones estándar de laboratorio.....	154
Tabla 7.4	Parámetros fisicoquímicos del agua del Río de la Plata (Punta Lara) y sitios de referencia determinados en campo o en laboratorio.....	158
Tabla 7.5	Caracterización del sedimento de diversos sitios de América Latina con especial énfasis en el estuario del Río de la Plata.....	159
Tabla 7.6	Caracterización de HAPs del sedimento superficial y MPS de Punta Lara y sitios de referencia del periodo 2010.....	162
Tabla 7.7	Índices de evaluación del origen de los HAPs registrados en los sitios de estudio y valores de referencia.....	163
Tabla 7.8	Caracterización de compuestos organoclorados del sedimento superficial y MPS de Punta Lara y sitios de referencia del periodo 2010.....	164
Tabla 7.9	Resumen del Análisis discriminante.....	167
Tabla 7.10	Índices fisiológicos de <i>Cyprinus carpio</i> luego de 14 días de exposición <i>in situ</i> en dos sitios del río Luján y el A° Durazno.....	171
Tabla 7.11	Índices fisiológicos de <i>Pimelodella laticeps</i> luego de 7 y 14 días de exposición <i>in situ</i> en dos sitios del río Luján (S1-S2) y el A° Las Flores (SRI).....	175
Tabla 7.12	Parámetros fisicoquímicos del agua superficial del río Luján y arroyos de referencia.....	178
Tabla 8.1	Resumen de la metodología empleada.....	199
Tabla 8.2	Coeficientes de variación de los parámetros biomarcadores analizados para cada especie y vía de exposición.....	202
Tabla 8.3	Índices fisiológicos de <i>Corydoras paleatus</i> en condiciones experimentales de laboratorio y campo durante el período estival e invernal.....	208

ABREVIATURAS:

APEs	Alquilfenoles polietoxilados
BaP	Benzo(a)pireno
BNF	β -naftoflavona
CAT	Catalasa
Co. Sv	Control solvente
Co	Control
COPs	Compuestos orgánicos persistentes
E2	17 β -estradiol
EDCs	Compuestos desorganizadores endócrinos
EROD	7-etoxiresorufin-O-deetilasa
EROs	Especies reactivas del oxígeno
ESM	Error estándar de la media
FC	Factor de condición
FS	Fracción sobrenadante
GST	Glutación-S-transferasa
HAs	Hidrocarburos alifáticos
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
I. ip	Inyección intraperitoneal
IBR	Índice de respuesta integrada (<i>Integrated biomarker response</i>)
ICP	Índice del carbono preferido
IHS	Índice hepatosomático
LPO	Peroxidación lipídica
MB	Metabolitos biliares
MDA	malon di-aldehído
MO	Materia orgánica
MOP	Materia orgánica particulada
MPQ	Máximas cantidades permitidas
MPS	Material particulado en suspensión
NGCS	Niveles guía de calidad de sedimento
NP	Nonilfenol
NPE	Nonilfenol polietoxilado
OD	Oxígeno disuelto
p.c.	peso corporal
p.s.	peso seco
PCBs	Bifenilos policlorados
PL	Punta Lara
POCs	Pesticidas organoclorados

PRS	Fósforo reactivo soluble
PTEL	Planta de tratamiento de efluentes líquidos
S. Co	Sedimento Control
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SOD	Superóxido dismutasa
SR	Sitio de referencia
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
Vtg	Vitelogenina

CAPÍTULO 1

Introducción General

1.1 La ecotoxicología

El término “ecotoxicología” ha sido introducido por Truhaut en 1969, derivado de las palabras ecología y toxicología, la introducción de este término reflejó una creciente preocupación por los efectos de sustancias químicas en el ambiente. Desde entonces, la ecotoxicología se ha convertido en una disciplina científica por derecho propio y se la define como la rama de la ciencia que estudia los efectos tóxicos de sustancias químicas y/o agentes físicos sobre los organismos vivos, especialmente sobre poblaciones y comunidades dentro de los ecosistemas, incluyendo el estudio de las vías de transferencia y sus interacciones con el medio ambiente (Richardson, 1995).

1.2 La contaminación del ambiente acuático

El crecimiento poblacional, la producción de alimentos y la demanda de nuevos materiales en las civilizaciones modernas tienen como resultado la producción de un gran número de compuestos diferentes siendo muchos de ellos nocivos para los organismos terrestres y acuáticos. La contaminación del ambiente acuático es un fenómeno de gran importancia producido por el aporte de innumerables compuestos tóxicos provenientes tanto de aportes naturales como de xenobióticos¹. Estos compuestos tóxicos se liberan de diferentes fuentes tanto puntuales como difusas e ingresan en los sistemas acuáticos por medio de: efluentes, deposición atmosférica, escorrentías y aguas subterráneas, distribuyéndose en la columna de agua y en el sedimento del fondo (Figura 1.1) (Erickson y col., 2008). En zonas altamente pobladas e industrializadas predominan los aportes antropogénicos, mientras que en áreas remotas la mayoría de los mismos tienen principalmente un origen natural. Una vez que los diferentes compuestos ingresan al ambiente acuático, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas (polaridad, solubilidad, densidad, presión de vapor, coeficiente de partición, etc.), según su afinidad serán distribuidos y se concentrarán en diferentes matrices biológicas y no biológicas (Figura 1.1).

¹ Sustancias extrañas que pueden ser introducidas por el hombre en un ecosistema acuático en forma deliberada o accidental provocando un deterioro de la calidad del agua con perjuicio para la vida acuática (Rand y col., 1995).

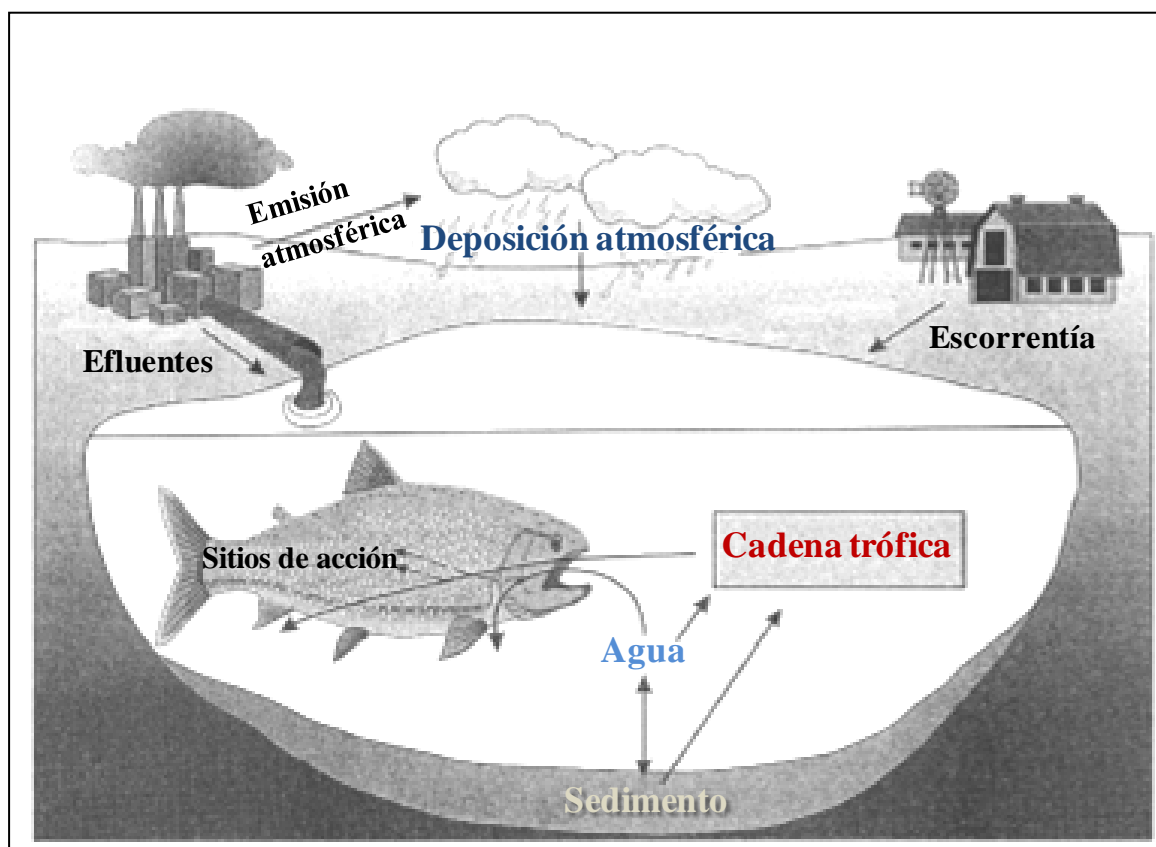


Figura 1.1. Esquema de las distintas fuentes de ingreso y distribución de los contaminantes en el ecosistema acuático así como las rutas de ingreso y acumulación en peces (tomado de Erickson y col., 2008)

La naturaleza y magnitud de los efectos adversos producidos por los contaminantes sobre los ecosistemas acuáticos es complejo, los organismos acuáticos, como por ejemplo los peces pueden estar expuestos a una mezcla de compuestos químicos a través del contacto directo con el agua, con el sedimento del fondo y en suspensión así como del alimento que ingieren. Al mismo tiempo, la toxicidad y capacidad de acumulación de los diferentes compuestos no sólo depende de la concentración total en el ambiente sino también de la facilidad con que los organismos pueden incorporarlos ya sea a través de las branquias, la piel, del tracto digestivo y de cómo las propiedades de cada compuesto afecta su distribución por todo el organismo.

1.3 Toxicidad y efectos de los compuestos orgánicos persistentes

El ambiente acuático es un importante reservorio de diversos poluentes, entre los cuales se encuentran los compuestos orgánicos persistentes (COPs) que poseen efectos adversos sobre la biota de estos ecosistemas, incluso cuando son vertidos en pequeñas cantidades (Linde-Arias y col., 2008; Torres y col., 2008). Los COPs son sustancias químicas que persisten en el ambiente, se bioacumulan a través de la red trófica y poseen riesgo de causar efectos adversos a la salud humana y al medio ambiente. Existen distintos COPs que resisten de forma variable a la degradación fotolítica, biológica y química. En este contexto se pueden encontrar sustancias tales como los hidrocarburos tanto alifáticos (HA) como aromáticos policíclicos (HAPs), los compuestos organoclorados (por ejemplo, bifenilos policlorados, PCBs) o sustancias de mayor polaridad como los fenoles tales como los alquilfenoles polietoxilados (APEs) y fenoles clorados. Debido a sus propiedades fisicoquímicas: alta hidrofobicidad, ubicuidad y persistencia, son acumulados adsorbiéndose al material orgánico en las partículas finas de suelo, sedimento y asociarse fuertemente al material particulado en el medio acuático. De esta forma, los sedimentos pueden actuar como un compartimiento de almacenamiento transitorio para los COPs y bajo condiciones hidrodinámicas específicas o en presencia de bioturbación, estos compuestos pueden ser resuspendidos y volver a estar biodisponibles. De esta manera los organismos que viven en ambientes contaminados por COPs pueden incorporar estos compuestos a través de su superficie corporal, de las branquias o por medio de la ingestión de alimento o sedimentos contaminados y luego ser transferidos a través de la cadena trófica. Por lo tanto, estos compuestos constituyen una seria amenaza a los ecosistemas acuáticos debido a la transferencia trófica, persistencia y toxicidad.

Los hidrocarburos constituidos por HA y HAPs debido a su relativa persistencia representan una preocupación desde el punto de vista ambiental. El origen de estos compuestos está asociado con procesos biogénicos (sintetizados por organismos), petrogénicos (introducido en el ambiente como consecuencia de las operaciones y usos del petróleo y sus derivados) o pirogénico (resultado de la combustión incompleta de la materia orgánica). Entre los HA, los *n*-alcanos son los más abundantes sin embargo los de cadenas lineales ramificadas y cíclicas tanto saturados como insaturados también están presentes en el

ambiente. La composición de las mezclas de hidrocarburos alifáticos encontradas en muestras ambientales puede ser un indicio de la influencia biogénica y/o antropogénicas en un área determinada. Los HAPs son moléculas que contienen dos o más anillos aromáticos de seis carbonos fusionados, son componentes naturales de materias primas orgánicas especialmente de petróleos crudos generados por pirólisis de materia orgánica. Su gran hidrofobicidad les confiere una alta persistencia en el ambiente adsorbiéndose al igual que los PCBs al sedimento, al material particulado y lípidos de los organismos acuáticos (Colombo y col., 2005a). Si bien pueden ser aportados en forma natural, la contaminación acuática originada por los mismos proviene principalmente por fuentes de origen antrópico y por lo tanto se los encuentra en cuerpos de agua cercanos a centros urbanos (Hyötyläinen y Oikari, 2004).

Los PCBs abarcan 209 compuestos (congéneres), los cuales varían en el número y posición de los átomos de cloro en la molécula de bifenilo. Se han utilizado en numerosos productos industriales tales como disolventes, fluidos hidráulicos, fluidos dieléctricos para capacitores y transformadores, etc. (Bonefeld-Jørgensen y col., 2001). En nuestro país la mezcla comercial de PCBs más utilizada ha sido el Aroclor[®] (Aroclor 1242, 1254 y 1260) (Aizpún de Moreno y col., 2004). La toxicidad de los HAPs y de los PCBs, en particular los congéneres coplanares mono-*orto* sustituidos (PCB 118) o no-*orto* sustituidos (PCB 77 y 126), se centra en su capacidad de actuar como ligandos del receptor Arilo hidrocarbonado (Ahr) que finalmente induce la síntesis de la proteína CYP1A (Schleizinger y Stegeman, 2000).

Los APEs, son surfactantes no iónicos presentes en detergentes y son utilizados como emulsionantes dispersantes y solubilizantes en la fabricación de agroquímicos, cosméticos pinturas, etc. Dentro del grupo de los APEs, se encuentran los nonilfenol etoxilados siendo el nonilfenol (NP) uno de los metabolitos más críticos debido a su resistencia a la biodegradación, capacidad para bioacumularse y el efecto de desorganizador endócrino (estrogenizante) (Staples y col., 1998; Soares y col., 2008). Debido al uso intensivo de los APEs en el ámbito doméstico, en la industria del papel y textil se los encuentra en cuerpos de agua que reciben descargas residuales. En los ecosistemas acuáticos la toxicidad de cada poluyente puede verse afectada por la presencia de otros pudiendo dar origen a interacciones aditivas, sinérgicas o antagónicas (Abel, 1989).

1.4 Cuerpos de agua de la provincia de Buenos Aires afectados por la contaminación antrópica

En nuestro país y en particular dentro del ámbito de la Provincia de Buenos Aires el impacto adverso de la contaminación antrópica por COPs es evidente en diversos cuerpos de agua y se encuentra reportada por diversos autores. Algunos ejemplos lo constituyen el estuario del Río de la Plata (Bilos y col., 1998; Colombo y col., 1989; 2000; Barra y col., 2002; Aizpún de Moreno y col., 2004, Carriquiriborde y col., 2007), que a su vez recibe una gran carga contaminante por el aporte de los ríos urbanos Matanza-Riachuelo (Evers y col., 1997; López y col., 1998; ACUMAR, 2012), río Luján (Giorgi, 1999; O'Farrell y col., 2002; Momo y col., 2003; Pizarro y Alemanni, 2005; Carballo, 2010; Peluso y col., 2013) y de la cuenca del río Reconquista (Rovedatti y col., 2001; de la Torre y col., 2005; Salibián, 2006), siendo éstas las tres principales cuencas del Área Metropolitana de Buenos Aires. Al mismo tiempo, otros tipos de cuerpos de agua afectados por la presencia de este tipo de contaminantes los constituyen las lagunas costeras (Menone y col., 2001) y las lagunas pampásicas (Miglioranza y col., 2003, 2004).

La cuenca del Plata es la segunda cuenca hidrográfica más extensa del continente sudamericano, abarca una superficie de 3.170.000 Km². Su sistema hidrográfico se despliega dentro de la jurisdicción de cinco países: Brasil, donde alcanza 1.415.000 km², le sigue Argentina con 920.000 km², Paraguay, 410.000 km², Bolivia, 205.000 km² y Uruguay 150.000 km² (Aizpún de Moreno y col., 2004; CIC, 2013). Se encuentra formada por tres grandes sistemas hídricos: el Paraná, el Paraguay y el Uruguay, además del Río de la Plata propiamente dicho. El río Paraguay es afluente del río Paraná, el cual se une con el río Uruguay formando el Río de la Plata, constituye el límite entre la Argentina y Uruguay y establece un área donde se concentra una importante actividad económica y la mayor densidad de población. El estuario del Río de la Plata localizado sobre la costa oeste del Atlántico Sur abarca un área de 30.000 km², posee una longitud aproximada de 300 km y 30 km de ancho en la parte más estrecha, hasta llegar a los 220 km en la desembocadura en el mar (Punta Rasa, Argentina- Punta del Este, Uruguay) (Barra y col., 2002). Este estuario se caracteriza por transportar alrededor de 500 a 880 km³ de agua dulce y 90 millones de toneladas de sólidos en suspensión al año. El transporte masivo de materiales alóctonos

alimenta a un gran delta frente al Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA), que comprende la zona de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y 24 partidos del Gran Buenos Aires (conurbano), posee 12.801.364 habitantes (INDEC, 2010) y nuclea la mayor concentración de industrias del país. A pesar de las dimensiones y gran capacidad de dilución del estuario, el aporte de efluentes industriales y cloacales originados en el AMBA y en la Ciudad de La Plata, así como los aportes de contaminantes y sedimentos de los ríos Paraná y Uruguay produjo un fuerte impacto en la calidad del agua y sedimento de la Franja Costera Sur del Río de la Plata (San Fernando-Magdalena), constituyendo un ejemplo típico de ambiente severamente contaminado por COPs (FREPLATA, 2003). Esta carga contaminante se ve reflejada claramente en la abundancia de las sustancias tóxicas persistentes en las aguas, los sedimentos y la biota de la zona (Aizpún de Moreno y col., 2004; Colombo y col., 2005 a, b; 2006; 2007). Por su parte, la Franja Costera Sur del Río de la Plata sustenta diversos usos tales como: usos productivos (destilerías, plantas productoras de energía, importantes puertos), usos recreativos (náutica, deportivo, zona de balnearios) y tomas de agua potable, siendo la principal fuente de agua potable para la región. Existen tres tomas de agua potable: la Planta Potabilizadora Gral. San Martín (Toma de Palermo) ubicada a 1050 m de la costa y con un caudal de toma máximo de 35 m³/s; la Planta Potabilizadora Manuel Belgrano (Bernal) ubicada a 2400 m de la costa y con un caudal máximo de 17 m³/s y la Planta Potabilizadora de Punta Lara, ubicada a 714 m de la costa y con un caudal máximo de 2.5 m³/s (FREPLATA, 2003).

La cuenca del río Luján recorre la zona noreste de la provincia de Buenos Aires y es uno de los sistemas hídricos más importantes del AMBA ya que se caracteriza por ser la de mayor densidad de drenaje. Cubre un área de 2.600 km², el curso del río Luján nace en la confluencia de los arroyos Los Leones y Del Durazno, a 8 km al norte de la Ciudad de Suipacha, atravesando la zona noroeste de la provincia de Buenos Aires y recorriendo unos 128 km hasta su desembocadura en el Río de la Plata. A lo largo de su curso, el río recibe las aguas de numerosos tributarios, entre ellos se pueden mencionar los arroyos Moyano, Leguizamón, Grande, Oro, Balta, Gutiérrez, Pereyra, Chañar y El Harás, Las Flores, Carabassa, Burgos, Escobar, Garín, Claro y de las Tunas y el río Reconquista (Momo y col., 2003; AABA, 2010; Busso, 2010). En el río se pueden distinguir tres tramos, uno superior, medio e inferior. El curso superior de 40 km de longitud, va desde las nacientes hasta Jáuregui

recibiendo los afluentes más importantes en caudal. El curso medio, va desde Jáuregui hasta la localidad de Pilar (30 km) donde el drenaje es mayor debido al relieve más acentuado y el inferior tiene menor pendiente y desemboca en la zona de San Fernando en el Delta (Giorgi, 1999; O'Farrell y col., 2002; Momo y col., 2003). La zona de esta cuenca ha sido utilizada principalmente para explotación agrícola-ganadera, sin embargo el crecimiento de las ciudades ha ido incrementando un uso urbano-industrial principalmente en el tramo inferior. Los principales aportes puntuales corresponden a descargas líquidas urbanas e industriales las cuales comienzan en la cuenca alta y se incrementan a medida que avanza hacia la desembocadura (Sánchez Caro, 2010). La cuenca alta recibe descargas de la industria láctica y de la planta de tratamiento de efluentes líquidos de la ciudad de Suipacha sin marcadas evidencias de dichos vuelcos en el cuerpo principal del río 15 km aguas abajo (en la localidad M. J. García). Sin embargo, luego de atravesar las ciudades de Mercedes, Jáuregui y Luján el río recibe las descargas de las plantas de tratamiento de efluentes líquidos (PTEL) urbanos e industriales de dichas ciudades. En particular en la localidad de Jáuregui se reciben los desechos de una curtiembre de gran tamaño, con elevada cantidad de materia orgánica y la presencia de ciertos metales pesados (cromo, cobre y mercurio). Posteriormente, por medio del arroyo Gutiérrez, tributario dentro de este distrito, recibe vertidos de industrias textiles (Giorgi y Malacalza, 2002; Sánchez Caro, 2010). Por su parte, al atravesar la ciudad de Luján recibe principalmente efluentes de las plantas de tratamiento de la ciudad, de barrios cerrados y de industrias (textil, cartón, cervecera, matadero-frigorífico y otras alimentarias) así como otras PTEL industriales que vuelcan sus efluentes al sistema cloacal de la ciudad (Sánchez Caro, 2010). Por lo tanto, la cuenca del río Luján presenta un estado ecológico variable con un deterioro paulatino hacia la desembocadura, concentrado principalmente en los tramos medio e inferior (Momo y col., 2003). Si bien en algunos tramos el sistema se recupera parcialmente, la carga de sustancias que no se procesan completamente pueden sedimentar en el fondo y dependiendo de las características de las mismas acumularse en los sedimentos (Sánchez Caro, 2010).

1.5 Biomarcadores de contaminación

Los ecosistemas acuáticos se han convertido en grandes depósitos de diversos contaminantes condicionando así a que los organismos acuáticos que viven en ellos puedan estar expuestos por largos períodos de tiempo a distintos xenobióticos aun en bajas concentraciones. De esta forma pueden promoverse serios efectos sobre la biota sin llegar a ser evidentes hasta que los cambios se manifiesten a nivel poblacional o de ecosistema, momento en el que pudiera ser demasiado tarde para tomar medidas adecuadas. Una estrategia que permite determinar el impacto de estos contaminantes sobre todo en concentraciones bajas o subletales así como sus potenciales efectos, es el uso de biomarcadores o señales tempranas de alerta (Fent, 2004; Linde-Arias y col., 2008). Los compuestos tóxicos a menudo causan respuestas características en el organismo afectado, conocidas frecuentemente como “*toxicological endpoints*” o “puntos finales toxicológicos” o “marcadores biológicos” o “biomarcadores” (Hartl, 2002). Se han dado varias definiciones para el término “biomarcador”, el cual utilizado en un sentido amplio incluye casi cualquier medición que refleje una interacción entre un sistema biológico y el riesgo potencial de un agente del medio, el cual puede ser de origen químico, físico o biológico (WHO, 1993). La definición estándar de "biomarcador" en la investigación del medio ambiente, tal como ha sido redefinido por van Gestel y van Brummelen (1996) se refiere a cualquier alteración a nivel de sub-individuo que refleja la exposición a un contaminante, determinadas dentro del mismo organismo o en sus productos (orina, heces, pelos, plumas, etc). Estos "cambios" son considerados como medidas de toxicidad. Los mismos autores marcaron diferencias con el término "bioindicador", el cual definen como un organismo cuya presencia, ausencia o alteración del comportamiento puede indicar un cambio en la calidad de los ecosistemas y con el de "indicador ecológico" que es un parámetro de los ecosistemas, que describe un efecto en la estructura y/o funcionamiento del mismo. Tradicionalmente los biomarcadores han sido divididos en tres categorías, según WHO (1993) y a la revisión de van der Oost y col. (2003) los podemos clasificar en:

biomarcadores de exposición, permiten detectar y medir sustancias exógenas, sus metabolitos o el producto de interacción a nivel molecular o celular dentro del organismo con

el agente xenobiótico, indicando que el organismo ha estado expuesto a una determinada clase de compuestos.

biomarcadores de efecto, incluyen mediciones bioquímicas, fisiológicas u otras referidas a las alteraciones que pudieran producirse dentro de los tejidos o en fluidos biológicos de los organismos, las cuales pueden asociarse al establecimiento de un posible daño en la salud, indicando que tanto la exposición como los efectos adversos han ocurrido.

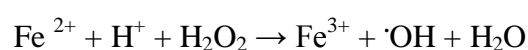
biomarcadores de susceptibilidad, indican la habilidad inherente o adquirida de los organismos de responder a la exposición de compuestos xenobióticos específicos, incluyendo factores genéticos y cambios en receptores, los cuales alteran la susceptibilidad de los individuos frente a dicha exposición.

En las últimas décadas su estudio adquirió un papel más activo en las evaluaciones ambientales siendo incorporado en varios programas de monitoreo ambiental en Europa y los E.E.U.U aunque no ha sido incorporada aún dentro de los Programas Nacionales de monitoreo en nuestro país y en Brasil. Las respuestas de una “batería” de biomarcadores bioquímicos y fisiológicos son utilizados frecuentemente para detectar o diagnosticar efectos subletales en peces ya sea en evaluaciones *in situ* o bien expuestos a efluentes o distintos tóxicos (ver revisión van der Oost y col., 2003). Actualmente la información generada a partir de los parámetros biomarcadores ha tomado creciente importancia como herramienta de evaluación ecotoxicológica de los ambientes acuáticos (Sanchez y Porcher, 2009).

Efecto de los contaminantes ambientales sobre biomarcadores de contaminación

Los COPs vertidos en los cuerpos de agua, pueden ser incorporados y acumulados en los tejidos de los organismos acuáticos directamente desde el agua, por medio de la captación de partículas en suspensión o por el consumo de organismos de niveles tróficos inferiores (ver Figura 1.1) (van de Oost y col., 2003). Una vez que ingresan a los organismos pueden bioacumularse o biotransformarse para poder ser excretados. La biotransformación de estos compuestos se lleva a cabo principalmente en el hígado por medio de dos fases: la fase I (enzimas monoxigenasas P450) y la II (enzimas de conjugación). Entre los biomarcadores de contaminación asociados a la biotransformación de fase I, el citocromo P450 1A (CYP1A) es

el componente terminal del sistema de las oxidasas de función mixta o monooxigenasas y es una enzima oxidativa de importancia en el metabolismo de muchos HAPs y algunos congéneres de PCBs. La inducción de este sistema está ligado con la estimulación del receptor intracelular Arilo hidrocarbonado (Ahr) que estimula la transcripción del gen en respuesta a los xenobióticos arriba mencionados. En peces, la actividad catalítica del citocromo P450 1A expresada en términos de la 7-etoxiresorufin-O-deetilasa (EROD), medición del contenido de la proteína CYP1A y los niveles de transcripción hepática han demostrado ser una herramienta de monitoreo muy útil. La información disponible de las CYP1A de algunas especies de teleósteos es abundante, contando información acerca del clonado, secuenciación, producción de anticuerpos específicos. A modo de ejemplo, de la Torre y col. (2003) reportaron para *Cyprinus carpio* la obtención en laboratorio de anticuerpos policlonales específicos demostrando la utilidad de esta metodología de evaluación en carpas y otras especies nativas expuestas a β -naftoflavona (inductor específico de la CYP1A) y en ensayos en campo. Entre las enzimas de la fase II, la glutatión-S-transferasa (GST) brinda protección celular contra los efectos tóxicos producidos por una variedad de compuestos químicos endógenos y ambientales incluidos los PCBs, endosulfán, microcistinas (Schlenk y col., 2008). La reacción más importante que lleva a cabo es la de conjugación del glutatión con sustancias que tengan átomos electrofílicos que pueden ser C, N o S. Así mismo, la vesícula biliar es una importante ruta de excreción de los HAPs, por lo tanto la determinación de los niveles de metabolitos biliares de HAPs es un parámetro biomarcador asociado a la biotransformación y detoxificación de este tipo de compuestos. Aunque la biotransformación en general es aceptada como un proceso de detoxificación, existen varios ejemplos, (β -naftoflavona, benzo(a)pireno, etc.) en los que pueden involucrarse reacciones que producen especies reactivas del oxígeno (EROs) tales como el anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) así como también producirse metabolitos electrofílicos. Al mismo tiempo, las EROs provienen de la reducción parcial del oxígeno molecular (O_2) y ocurre en todos los organismos aeróbicos, siendo una de las principales fuentes la cadena respiratoria. Por otra parte, el H_2O_2 puede reaccionar con metales divalentes (libres o unidos a proteínas) y producir $\cdot OH$, vía reacción de Fenton:



A bajas concentraciones las EROs cumplen funciones celulares y fisiológicas esenciales, pero al acumularse pueden reaccionar con macromoléculas como lípidos, proteínas y ADN, produciendo lo que se conoce como daño oxidativo (Rand, 1995). Para resistir al potencial efecto deletéreo de las EROs, los organismos aeróbicos han desarrollado un sistema de defensa antioxidante. El desarrollo de estos diversos mecanismos antioxidantes puede considerarse como el "costo" para la alta eficiencia energética que ofrece el oxígeno como aceptor terminal de electrones (Rand, 1995; Livingstone, 2001). Este sistema incluye defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. Bajo condiciones fisiológicas normales existe una continua generación de especies reactivas las que son controladas en gran manera por los antioxidantes endógenos mediante el *scavenging* de las EROs. Sin embargo, cuando las fuerzas pro-oxidantes sobrepasan a las defensas antioxidantes (enzimáticas y no enzimáticas) el estrés oxidativo celular queda establecido. Entre las defensas antioxidantes enzimáticas más importantes se pueden incluir las llevadas a cabo por la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT). La SOD, cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ formando oxígeno y H_2O_2 el cual en si mismo también es una EROs que puede ser removido por la actividad de otra de las enzimas antioxidantes, la CAT que lo reduce a oxígeno y agua. Por su parte, determinados efectos bioquímicos y fisiológicos han sido asociados con el incremento de EROs, pudiendo ser buenos indicadores de estrés oxidativo. Respecto a las defensas antioxidantes no enzimáticas, el glutatión reducido (GSH) juega un rol crítico en la protección celular así como en el metabolismo y detoxificación de compuestos tóxicos y es considerado como la primera línea de defensa celular, previniendo la acción tóxica de las EROs. El balance de la concentración intracelular de este compuesto queda establecido por las reacciones de síntesis y las que consumen GSH, como por ejemplo las mediadas por la actividad de la glutatión-S-transferasa (GST), enzima de biotransformación de la fase II, que también reviste gran importancia en el metabolismo endógeno de la detoxificación de productos de estrés oxidativo (Schlenk y col., 2008). Cabe destacar que los mecanismos de defensas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos actúan de forma cooperativa y coordinada de forma tal de inactivar y eliminar del medio a las EROs. En la Figura 1.2 se representan las reacciones químicas correspondientes a las defensas antioxidantes más relevantes. Cuando el incremento de las EROs por cualquiera de las vías antes mencionadas es significativamente superior y el sistema de defensa es incapaz de salvar esta situación, se puede producir daño en macromoléculas. De esta forma, la inducción de las EROs aumenta la oxidación de los ácidos

grasos polinsaturados, incluyendo la peroxidación lipídica (LPO) de las membranas celulares. Por lo tanto, la LPO medida como los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) es frecuentemente utilizada como un biomarcador de estrés oxidativo en peces (Livingstone, 2001; Oakes y Van Der Kraak, 2003).

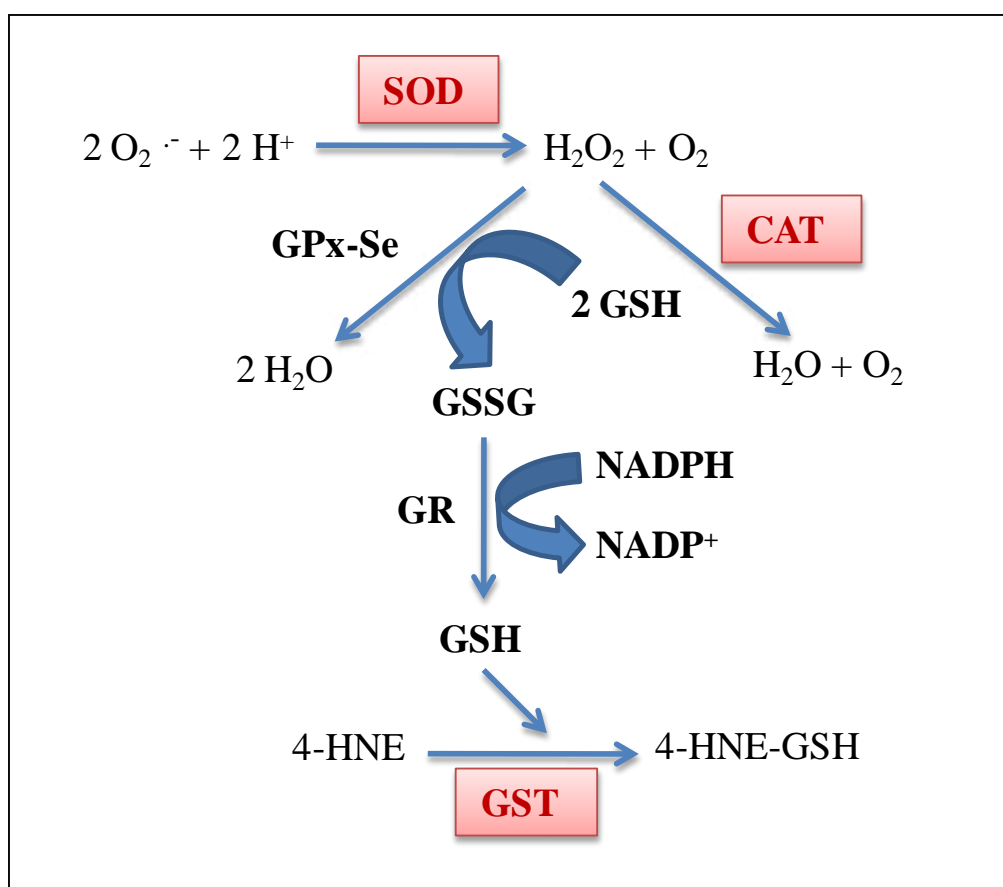


Figura 1.2. Esquema de los mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa; GPx-Se: glutatión peroxidasa selenio dependiente; GR: glutatión reductasa; GST: glutatión-S-transferasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; 4-NHE: 4-hidroxinonal. Recuadradas en color rojo se indican los parámetros evaluados en el presente trabajo.

Por su parte, la liberación antrópica de poluentes al medio acuático provoca también efectos adversos de gran impacto en la fecundidad y supervivencia de las especies. En los peces se han documentado algunas alteraciones a nivel reproductivo que incluyen la

alteración de la síntesis de proteínas específicas como la vitelogenina, la embriogénesis, el comportamiento social/sexual, la reproducción, la viabilidad de la descendencia, y el desarrollo endocrino natural (Pérez Carrera y col., 2007; Rey Vázquez y col., 2009; Genovese y col., 2012). Los compuestos que modifican la actividad endócrina en los organismos acuáticos son conocidos como compuestos desorganizadores endócrinos. Entre los desorganizadores endócrinos que ejercen acción estrogénica se encuentran los metabolitos de los APEs, NP, algunos PCBs, etc. La evaluación de los niveles circulantes de la proteína vitelogenina es una metodología muy utilizada como marcador de exposición a dichos compuestos en los peces (Hennies y col., 2003; van der Oost y col., 2003; Rey Vázquez y col., 2009).

1.6 Los peces como organismos prueba

Los peces constituyen aproximadamente la mitad del número total de especies de los vertebrados vivientes conocidos, así mismo representan la clase de vertebrados más diversa con unas 28000 especies descritas hasta el momento. Esta diversidad taxonómica se refleja en una diversidad de formas corporales, estilos de vida y fisiología que también reflejan la gran diversidad de los sistemas acuáticos que habitan estos organismos (Rand, 2008). En particular los teleósteos han ocupado una enorme variedad de nichos ecológicos tanto límnicos como marinos, al ser consumidores primarios, secundarios y terciarios, representan diferentes niveles dentro de la trama trófica, de allí la existencia de una considerable diversidad morfológica, fisiológica y ecológica cuando se investigan potenciales interacciones entre las sustancias químicas del ambiente y los peces (Nagel e Isberner, 1998). Al mismo tiempo, los peces son un recurso valioso para el hombre, representan un elemento importante en la economía de muchos países ya que las pesquerías comerciales no son sólo importantes para países industrializados sino también para aquellos en desarrollo (Nagel e Isberner, 1998). Aunque los peces pueden no ser los organismos acuáticos más sensibles a los compuestos químicos estresores, sin duda presentan una amplia gama de comportamientos y hábitos que incrementan su potencial frente a la exposición a productos químicos en diferentes matrices ambientales, ya sea que se encuentren disueltos, adsorbidos, suspendidos o depositados (Rand, 2008). Por lo tanto, los peces merecen especial atención como sistema de

monitoreo en la vigilancia y evaluación de la salud de los ecosistemas acuáticos, debido a que sus cambios bioquímicos y fisiológicos sirven como biomarcadores de contaminación, es por ello que se han convertido en los organismos prueba clásicos y son considerados organismos apropiados para monitorear ambientes acuáticos contaminados (Hartl, 2002; van der Oost y col., 2003; Rand, 2008; Cazenave y col., 2009).

El uso de especies prueba estandarizadas en ensayos de toxicidad ha sido adoptado debido al conocimiento de ciertos aspectos tales como: la fisiología y bioquímica del organismo, tamaño y estado reproductivo, factibilidad de realizar la exposición de los organismos en jaulas así como la facilidad de muestreo y disponibilidad en suficiente número, nivel trófico del organismo, sensibilidad, etc. De esta forma, se facilita la interpretación de las respuestas de los biomarcadores evaluados. Sin embargo, el uso de especies nativas como organismos prueba en este tipo de estudio proporciona otras ventajas como una mayor relevancia ecológica brindando información más realista para cada región. El monitoreo de especies nativas constituye un enfoque realista del impacto adverso de los contaminantes sobre un ambiente en particular. Las respuestas de los biomarcadores evaluadas en especies silvestres representan una efectiva metodología para la realización de monitoreos de rutina de un conjunto de ecosistemas ya que proporciona una base cuantitativa del estado actual y de las tendencias a largo plazo de los niveles de exposición o de los efectos adversos producidos sobre especies críticas. En el ámbito de la Provincia de Buenos Aires existe un considerable número de especies dulceacuícolas en sitios potencialmente amenazados por la actividad antrópica. La presencia de estas especies en dichos sitios las hace potencialmente aptas para ser consideradas en evaluaciones ambientales utilizando el enfoque de los biomarcadores.

1.7 Bioensayos de laboratorio y de campo

Los ensayos de toxicidad de laboratorio proporcionan un importante control experimental para la evaluación de variables específicas, mientras que los estudios de especies nativas en campo proveen una evaluación más realista de la condición ecotoxicológica de determinado ambiente (Crane y col., 2007). Sin embargo, los estudios de laboratorio son importantes para la validación de los biomarcadores como métodos para evaluación de la

condición ecotoxicológica en ambientes en estudio (Mayer y col., 1992). Al mismo tiempo, los resultados de bioensayos de laboratorio con especies representativas requieren una extrapolación a la situación de campo ya que el monitoreo de especies nativas puede verse afectado por perturbaciones del hábitat, movilidad y distribución irregular de dichas especies (Figura 1.3). Por su parte, algunos compuestos como los COPs, son contaminantes que pueden ser incorporados en los organismos acuáticos a través de diferentes rutas de ingreso, por ejemplo en los peces una vía de entrada importante es a través de los alimentos y sedimentos contaminados (Figura 1.1). Debido a sus características químicas estos compuestos se acumulan en los sedimentos, donde se encuentran en concentraciones más elevadas que las detectadas en el agua. Por lo tanto, una metodología que permite evaluar la calidad de los cuerpos de agua y validar las respuestas de biomarcadores son los bioensayos de toxicidad con peces utilizando sedimentos fortificados con sustancias tóxicas de relevancia ambiental. Al mismo tiempo, los ensayos de toxicidad con sedimentos ambientales completos son ampliamente utilizados en evaluaciones de impacto ecológico de la actividad humana sobre peces. Los sedimentos contaminados contienen regularmente mezclas químicas complejas, dando lugar a potenciales efectos sinérgicos y/o antagonistas (Hartl y col., 2002). En este caso los organismos prueba pueden ser expuestos en el laboratorio a sedimentos ambientales completos, recogidos de sitios de interés y comparar con la exposición a sedimentos colectados de sitios de referencia o utilizando sedimentos artificiales como control. Sin embargo, pocos estudios se han dedicado a la comparación directa entre bioensayos de laboratorio y en campo (*in situ*) utilizando sedimentos completos y peces como organismos prueba. Una metodología que permitiría incrementar las condiciones controladas de los ensayos de laboratorio y a su vez incrementar el realismo ambiental que brindan los ensayos a campo es la comparación entre bioensayos de laboratorio utilizando sedimentos ambientales completos de sitios contaminados y ensayos *in situ* utilizando peces como organismos prueba.

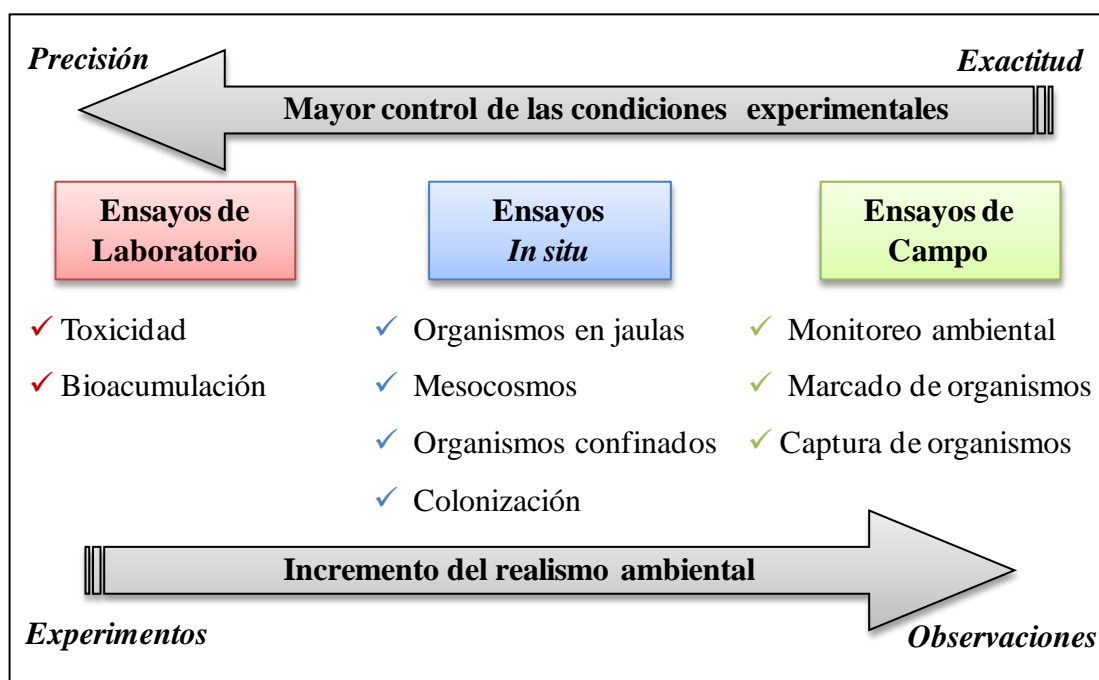


Figura 1.3. Ensayos *in situ* como nexo entre las condiciones controladas en el laboratorio y el realismo ambiental en ensayos de campo (Crane y col., 2007)

La inclusión de organismos prueba en un sitio determinado mediante su confinamiento en jaulas y posterior evaluación de parámetros biomarcadores es una metodología frecuentemente adoptada por diversos autores (Beyer y col., 1996; van der Oost y col., 1998; Smolders y col., 2004; Bervoets y col., 2009). Mediante esta técnica los animales, recolectados en ambientes prístinos o bien obtenidos a partir de proveedores comerciales, son confinados en las jaulas por períodos variables con el objeto de analizar los efectos sobre los biomarcadores luego de su exposición en sitios poluidos. Esta metodología proporciona diversas ventajas ya que disminuye algunas de las fuentes de variabilidad presentes en los estudios de evaluación ambiental con organismos recolectados. En este sentido se garantiza la exposición continua y durante un período conocido de los organismos prueba a las condiciones de un sitio en particular, y además, las respuestas de los individuos podrían confirmar la relación entre sitios específicos y los patrones de respuesta de biomarcadores evaluados en animales silvestres. Otra ventaja importante de la exposición de organismos prueba en jaulas es la capacidad de integrar las verdaderas condiciones ambientales sobre la exposición a sustancias químicas. De hecho, desde el punto de vista de la toxicología ambiental, la simulación de variables naturales en el laboratorio es una de las tareas más

difíciles de implementar. Por lo tanto, estos ensayos pueden servir como una primera validación en campo de los mecanismos tóxicos que se evidencian en ensayos de laboratorio. De esta manera, la evidencia de que los peces han estado expuestos durante un cierto tiempo en un sitio contaminado con determinados compuestos aumenta los posibles vínculos causales observados en los parámetros biomarcadores. En muchos casos, el contacto o el acceso a los sedimentos es un requisito necesario para establecer la exposición principalmente en el estudio de COPs (Oikari, 2006). El empleo de organismos libres de contaminación en los ensayos garantiza que los efectos adversos en los peces fueron producidos por la exposición ambiental; por su parte la técnica podría ser de suma utilidad en caso de existir escasa disponibilidad de ejemplares en los sitios de interés. Por su parte, la implementación de bioensayos de laboratorio y campo utilizando biomarcadores como punto final de evaluación ha sido considerado como una metodología eficiente y rentable para evaluar la toxicidad de los contaminantes ambientales (Costa y col., 2011; 2012).

La evaluación ecotoxicológica de contaminación acuática se puede realizar utilizando diferentes metodologías. En particular, en biomonitoreo acuático los métodos *in situ* han demostrado ser más apropiados que los análisis químicos, pruebas de laboratorio y estudios de la biota residente. En este contexto, los biomarcadores se han propuesto como herramientas integradoras y sensibles para la “detección temprana” de los efectos biológicos y por ello se han incorporado en diversos programas de monitoreo ambiental (Beliaeff y Burgeot, 2002; van der Oost y col., 2003; Crane y col., 2007; Sanchez y Porcher, 2009).

CAPÍTULO 2

Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS GENERAL

Los compuestos orgánicos persistentes de origen antrópico presentes en distintas matrices de los cuerpos de agua ejercen efectos adversos en la ictiofauna allí presente y pueden promover respuestas en diferentes parámetros biomarcadores integrados en distintos niveles de complejidad biológica (molecular, bioquímica, fisiológica y morfométrica). El estudio de estos parámetros permitirá evaluar la calidad ecotoxicológica de dichos cuerpos de agua.

OBJETIVO GENERAL

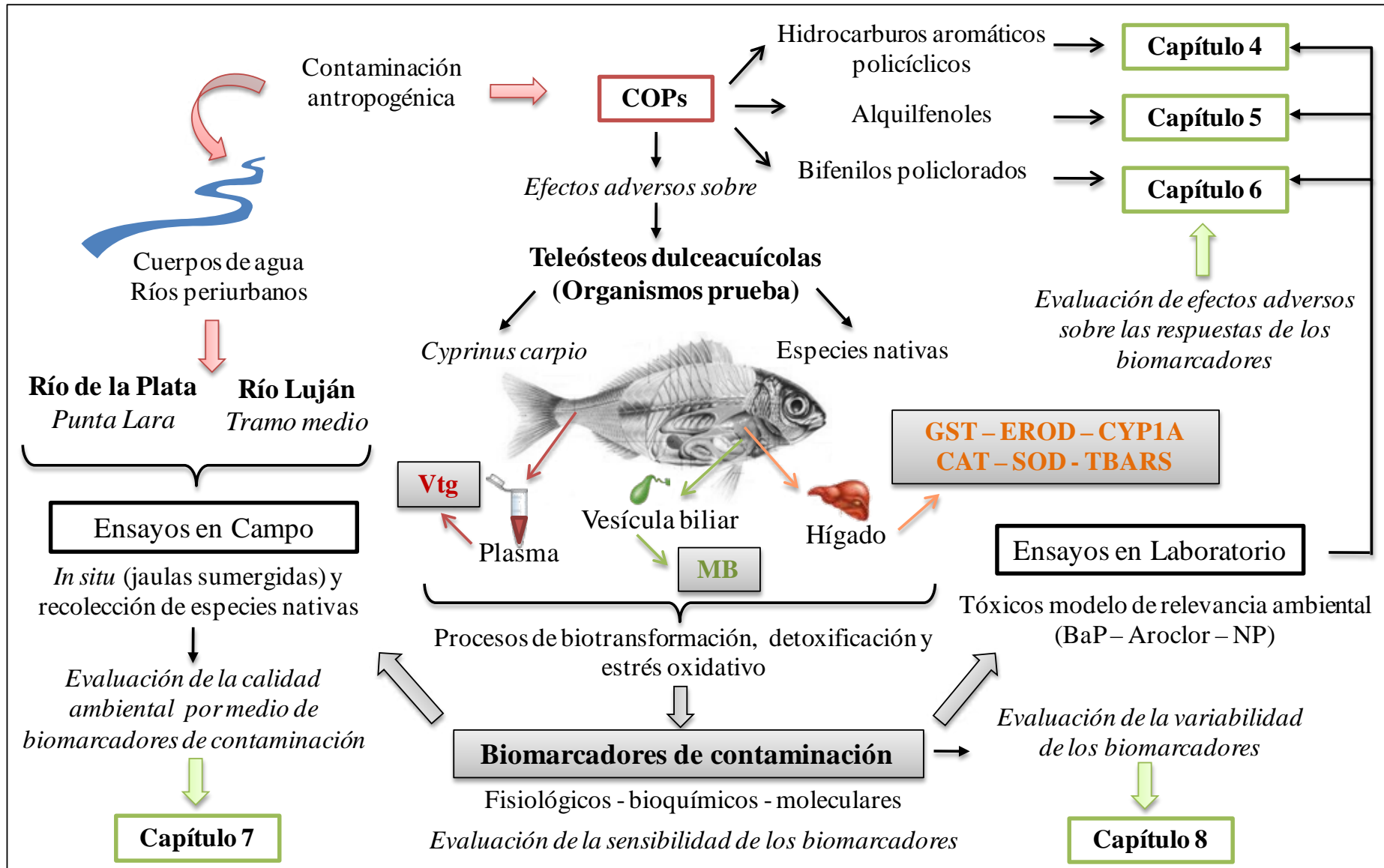
Evaluar la respuesta de una batería de biomarcadores morfométricos, bioquímicos y moleculares en teleósteos dulceacuícolas, útiles y aplicables en la evaluación de la calidad de cuerpos de agua afectados por compuestos orgánicos persistentes de origen antrópico. Vincular la exposición a dichos compuestos con las respuestas de parámetros biomarcadores asociados a procesos de biotransformación, de estrés oxidativo y a la presencia de compuestos desorganizadores endócrinos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En particular se planteó:

- Evaluar las respuestas de biomarcadores hepáticos en las especies prueba frente a diferentes compuestos orgánicos persistentes de relevancia ambiental por medio de su exposición en distintas matrices.
- Evaluar la interacción de un PCB coplanar con un desorganizador endócrino (17 β -estradiol, E2) y un hidrocarburo aromático policíclico (benzo(a)pireno) por medio de la co-exposición de estos compuestos.

-
- Evaluar el efecto de tóxicos presentes en sedimento sobre las respuestas de los biomarcadores propuestos incorporando una metodología poco empleada en estudios con peces por medio de la exposición a sedimento fortificado con diferentes COPs: a) con benzo(a)pireno, b) con Aroclor 1254:1260, c) con nonilfenol.
 - Evaluar la respuesta de los biomarcadores en las especies prueba mediante ensayos a campo por exposición *in situ* de peces confinados en jaulas y recolección de ejemplares de las zonas de estudio.
 - Evaluar y comparar las respuestas de los biomarcadores luego de la exposición a tóxicos presentes en Punta Lara bajo condiciones de campo por medio de la exposición *in situ* con jaulas sumergidas y bajo condiciones de laboratorio por medio de muestras ambientales de sedimento.
 - Obtener y evaluar un antisuero dirigido contra la proteína vitelogenina de *Cyprinus carpio* que sea útil como herramienta para la detección de los efectos de compuestos desorganizadores endócrinos en peces.
 - Evaluar la variabilidad de los biomarcadores en las especies estudiadas.
 - Evaluar la incidencia de las condiciones ambientales en la respuesta de los biomarcadores luego de una exposición aguda a un HAP.
 - Generar información de base sobre una batería de biomarcadores de peces susceptible de ser utilizada en programas de biomonitoreo.



CAPÍTULO 3

Metodología General

3.1 Organismos prueba

Se utilizaron como organismos prueba teleósteos dulceacuícolas que se encuentran presentes en cuerpos de agua de la provincia de Buenos Aires. En particular, se seleccionó una especie estandarizada y diferentes especies nativas frecuentadoras de fondo, que se adapten a las condiciones de cautiverio.

A continuación se detallan las especies utilizadas:

- *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758)

Clase: Actinopterygii

Orden: Cypriniformes

Familia: Cyprinidae

Nombre común: Carpa común, carpa, carpa de espejos



Cyprinus carpio es una de las especies prueba estandarizadas que los Organismos Internacionales como la OECD (Organization of Economic Cooperation and Development) recomiendan utilizar en ensayos de toxicidad aguda y prolongada. Esta especie ha sido introducida oficialmente en estanques públicos de Buenos Aires en 1925, con fines comerciales y deportivos. El primer reporte de la presencia de la especie en estado salvaje en el Río de la Plata fue realizado en 1945, en la actualidad es un residente común y abundante en el Río de la Plata interior (López y col., 2003). Así mismo, su presencia como especie exótica fue registrada en diversos ambientes acuáticos, cohabitando con las demás especies de la ictiofauna de la Provincia de Buenos Aires. A su vez, es una especie muy tolerante tanto a la contaminación como a las altas temperaturas. Por su parte, los peces pertenecientes a este orden se caracterizan por poseer boca muy protráctil, en general con barbillas y dentición faríngea, son de agua dulce o salobre y dominantes en el Sudeste de Asia, África, América del Norte y Europa. Es una especie bentopelágica. Se la encuentra en aguas de corriente débil o nula; su alimentación está compuesta de algas, plantas acuáticas mayores, pequeños animales o partículas filtradas del barro. (Menni, 2004). Todo esto, sumado a la existencia de un importante número de contribuciones científicas de referencia hacen de la carpa un organismo

prueba muy útil en evaluaciones de toxicidad. En este trabajo se seleccionó como especie prueba estandarizada a *Cyprinus carpio*, ya que también es considerada una especie resistente y tolerante a condiciones relativamente extremas de manipuleo (Oikari, 2006). Al mismo tiempo, existen antecedentes del uso de esta especie prueba en ensayos a campo para evaluar la calidad de ambientes acuáticos por medio del confinamiento en jaulas (van der Oost y col., 1998; de la Torre y col., 2000; Smolders, y col., 2004; Bervoets y col., 2009).

- *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837)

Clase: Actinopterygii

Orden: Characiformes

Familia: Anostomidae

Nombre común: Boga, bogón



Las bogas prefieren las aguas profundas de ambientes lóticos. Es una especie migradora, omnívora se alimenta de granos, semillas, vegetales y peces pequeños. En el bajo Paraná y Río de la Plata se ha percibido un aumento poblacional, aparentemente relacionado con la inclusión de la almeja asiática *Limnoperna fortunei* en su dieta (Cappato y Yanosky, 2009). En Argentina se distribuye en las siguientes cuencas: Río Paraguay y afluentes, Río Paraná Superior, Medio e Inferior, Delta y afluentes, Río Uruguay Superior, Medio e Inferior y afluentes, Río de la Plata y afluentes, Río Salí, Río Dulce, Río Urueña, Río Horcones (Liotta, 2005; Cappato y Yanosky, 2009). Es una especie de valor deportivo y comercial utilizada para el consumo humano. Por su parte, es una especie sensible en la detección de posibles efectos a la contaminación ambiental (Silveira Moraes y col., 2007). En particular ha sido utilizada como especie prueba en la evaluación de efectos subletales por exposición a diferentes herbicidas utilizados en campos de arroz en el sur de Brasil tanto en ensayos de laboratorio (Gluszczak y col., 2006; Braga da Fonseca y col., 2008; Silveira Moraes y col., 2009) como en ensayos a campo (Pretto y col., 2011).

- *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)

Clase: Actinopterygii
Orden: Characiformes
Familia: Prochilodontidae
Nombre común: Sábalo



El sábalo es el recurso íctico más abundante de la Cuenca del Plata constituyendo más del 60% de la ictiomasa, se utiliza para consumo, comercio interno y exportación (Cappato y Yanosky, 2009). Es una especie de hábitos migratorios que se encuentra en ambientes lóticos; sus juveniles habitan ambientes lénticos de las planicies de inundación de los grandes ríos. En la Cuenca baja del Plata, la mayor parte de las poblaciones del río Uruguay inferior y del Río de la Plata se desplazan aguas arriba hacia el Paraná inferior y medio a comienzos del otoño, y retornan en primavera, al aumentar la temperatura de las aguas, recorriendo distancias de hasta 1.000 km. Por su parte, es una especie de gran importancia ecológica por su papel en el ecosistema. Es un pez iliófago, detritívoro estricto, se alimenta de los detritos contenidos en los sedimentos del fondo del río y de los cuerpos de agua asociados. Presenta adaptaciones anatómicas y fisiológicas para la recolección y digestión eficiente de detritos (Bowen, 1983). Posee una boca protractil con rebordes orales que permite separar partículas inorgánicas gruesas de la materia orgánica floculante seguido por una estructura de filtrado. El estómago presenta una región pilórica altamente muscularizada con la que muele el alimento y numerosos apéndices que facilitan la asimilación, también posee numerosos pliegues en la mucosa del intestino la cual incrementa la superficie de absorción intestinal (Speranza y Colombo, 2009). De este modo juegan un rol valioso en el proceso de transformación de la materia orgánica. Al mismo tiempo, de acuerdo a los hábitos alimenticios es capaz de incorporar los contaminantes que se presentan no sólo en la columna de agua, sino también asociados a las partículas de sedimento (Lombardi y col., 2010). En el presente trabajo se seleccionó esta especie principalmente debido a la presencia de la misma en la zona de Punta Lara y a sus hábitos alimenticios que permiten la incorporación de los COPs allí presentes. Existen reportes de la capacidad de esta especie de bioacumular y biomagnificar a lo largo de la cadena alimenticia la concentración de COPs con los posibles riesgos de afectar la salud humana (Colombo y col, 2000, 2007; Aizpún y col, 2004; Speranza y Colombo, 2009). Al

mismo tiempo ha sido seleccionada como especie prueba en estudios de evaluación de calidad de cuerpos de agua utilizando parámetros biomarcadores (Almeida y col., 2005; Camargo y Martinez, 2006; Simonato y col., 2008; Cazenave y col., 2009)

- *Pimelodella laticeps* (Eigenmann, 1917)

Clase: Actinopterygii

Orden: Siluriformes

Familia: Pimelodidae

Nombre común: Bagrecito, Bagarito, bagre cantor



El bagrecito es el más pequeño de los bagres pampeanos. Es una especie frecuentadora de fondo y de la vegetación de los ecosistemas que habita (Rosso, 2007). A continuación se mencionan algunas características que comparten algunas especies del género *Pimelodella* y *Pimelodus*. Poseen barbillas y ojos bien desarrollados, espinas punzantes en su aleta dorsal y en las pectorales. Son organismos comparativamente lentos y en gran medida sedentarios. Presentan una alimentación omnívora que corresponde a predadores oportunistas, eurípagos, relacionados con las comunidades bentónicas (Menni, 2004).

- *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842)

Clase: Actinopterygii

Orden: Siluriformes

Familia: Callichthyidae

Nombre común: Corydoras, tachuela, limpiavidrios



Las *Corydoras* son especies de amplia distribución en el continente sudamericano y de uso común en el acuarismo. Es una especie común en la mayoría de los cuerpos de agua de la región pampeana. Se encuentra en ambientes con características diversas desde arroyos de

sierras, poco cargados con sólidos disueltos hasta los ambientes altamente turbios de la llanura pampeana al noroeste de la provincia de Bs. As. Como adaptación para responder al desbalance hídrico, característica de esta región, cuando un cuerpo de agua se reduce drásticamente, esta especie puede tolerar hasta 800 minutos la exposición al aire libre (dependiendo de la humedad relativa del ambiente). Algo similar ocurre con *P. laticeps* aunque con una menor performance (Rosso, 2007). Es una especie bentónica, aunque de vez en cuando los individuos emergen para intercambiar oxígeno atmosférico cuando su concentración en el agua disminuye drásticamente, por lo tanto se la considera respiradora aérea facultativa (Gómez, 1993). A su vez, posee la capacidad de responder frente a las bajas concentraciones de oxígeno en cuerpos de agua contaminados modificando ciertos parámetros fisiológicos y bioquímicos como por ejemplo el incremento en el número de glóbulos rojos, en la concentración de hemoglobina o en la afinidad de esta por el oxígeno (Cazenave y col., 2005). Es una especie que preda principalmente sobre los invertebrados que habitan en el fondo de los cuerpos de agua. Al mismo tiempo, esta especie fue seleccionada como organismo prueba ya que es fácilmente adaptable y puede ser mantenida bajo condiciones de laboratorio y ha sido utilizada en bioensayos de toxicidad así como en ensayos a campo evaluando las respuestas de diferentes parámetros biomarcadores (Cazenave y col., 2006; Monserrat y col., 2008; Pesce y col., 2008).

- *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828)

Clase:	Actinopterygii
Orden:	Siluriformes
Familia:	Callichthyidae
Nombre común:	Cascarudo



Esta especie pertenece al grupo de siluriformes, presentan placas verticales que forman dos filas en cada flanco, entrecruzándose a lo largo de la línea lateral y cubriéndolo totalmente. Son comúnmente encontrados en ambiente someros de nuestro país y son organismos sedentarios. Tiene cuerpo alargado y ligeramente comprimido, la boca se ubica

en posición subterminal inferior, con barbillas y las aletas pectorales y la dorsal presentan el primer radio espinoso. Son respiradores aéreos obligados en los que el órgano respiratorio es la pared intestinal, son muy resistentes a condiciones extremas (Menni, 2004). En períodos de sequía son capaces de desplazarse sobre el suelo en busca de nuevos ambientes acuáticos. Es una especie de valor comercial ya que se la utiliza como carnada. Esta especie ha sido seleccionada por su capacidad de resistir a condiciones extremas y adaptarse a condiciones de laboratorio así como por sus hábitos alimenticios, tanto los juveniles como los adultos se alimentan removiendo el fondo, se han encontrado en su contenido estomacal diferentes micro crustaceos e insectos que habitan en fondos limosos (Winemiller, 1987). Al mismo, tiempo ha sido utilizada como especie prueba en ensayos de exposición a metales pesados evaluando parámetros biomarcadores hematológicos y enzimáticos (Ale y col., 2012) y sometidos a situaciones de estrés evaluando los efectos bioquímicos y fisiológicos mediante diferentes biomarcadores (Rossi y col., 2012).

3.2 Diseños experimentales

En el presente capítulo se presenta el diseño experimental y los procedimientos generales que se llevaron a cabo a lo largo de todo el estudio, en los capítulos siguientes se detallará el diseño empleado en cada uno de los ensayos así como las técnicas empleadas en las determinaciones de los tóxicos en las distintas matrices. Se utilizaron dos metodologías experimentales para evaluar la respuesta de los distintos parámetros biológicos de las especies prueba: bioensayos de laboratorio y bioensayos de campo.

En todos los casos los peces utilizados en cada ensayo fueron seleccionados al azar y sometidos a un período de aclimatación de al menos una semana en condiciones de laboratorio con temperatura y fotoperíodo acordes a las condiciones del ensayo posterior. Durante este período se suministró alimento diariamente por medio de alimentadores con el 1% del peso corporal (p.c.) promedio con alimento comercial para peces con la siguiente composición: proteína cruda 47%, fibras 2%, humedad 10%, cenizas 13% (Figura 3.1).

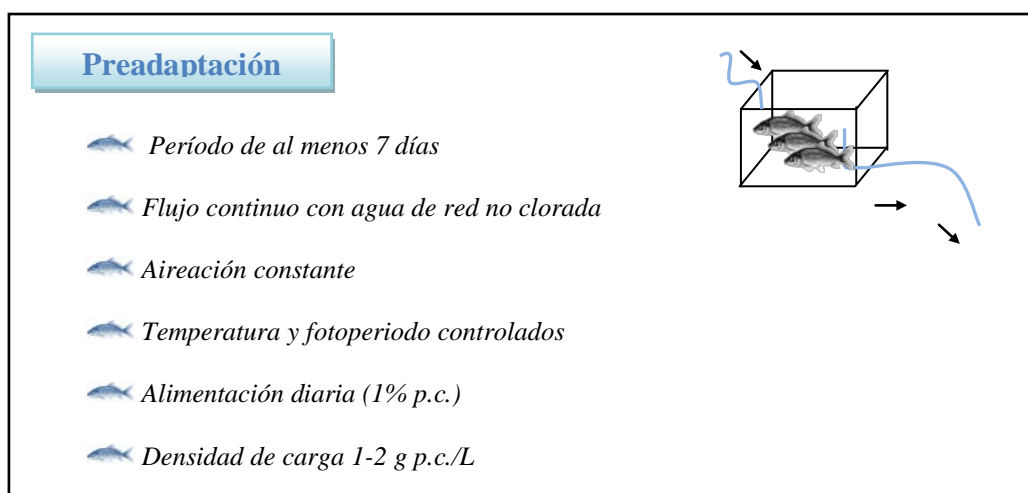


Figura 3.1. Esquema de preadaptación. Consideraciones generales tenidas en cuenta durante el período de preadaptación de todos los ensayos.

3.2.1 Bioensayos de laboratorio

Se realizaron por medio de intoxicación inducida por exposición a diferentes tóxicos por medio de una única inyección intraperitoneal y por exposición en distintas matrices. En el último caso, se realizaron ensayos de intoxicación a través de una exposición que se asemeje a lo que puede ocurrir en el ambiente natural, por medio de exposición del tóxico en agua, en sedimentos fortificados (tipo *spiked*) y muestras de sedimentos ambientales.

a- Inyección intraperitoneal: se utilizaron tres tipos tóxicos tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (BNF, BaP), desorganizadores endócrinos (NP, E2) y bifenilos policlorados (PCB coplanar). Los ensayos fueron del tipo *flow through*, estableciendo un sistema de flujo continuo con agua de red no clorada (40-50 ml/min), una densidad de carga en cada acuario de 1-2 g/L y bajo condiciones estándar con un fotoperíodo 12/12h D/N y temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$). Los tóxicos fueron administrados por medio de una única inyección intraperitoneal administrada en una relación de 10 ml/kg de peso corporal (p.c.) y disueltos en aceite de maíz. En todos los casos los individuos control solo recibieron aceite de maíz en la misma relación. La inducción fue de tipo aguda, con un tiempo de exposición corto de 48-72h. En la Figura 3.2 se resumen el esquema de este tipo de ensayos.

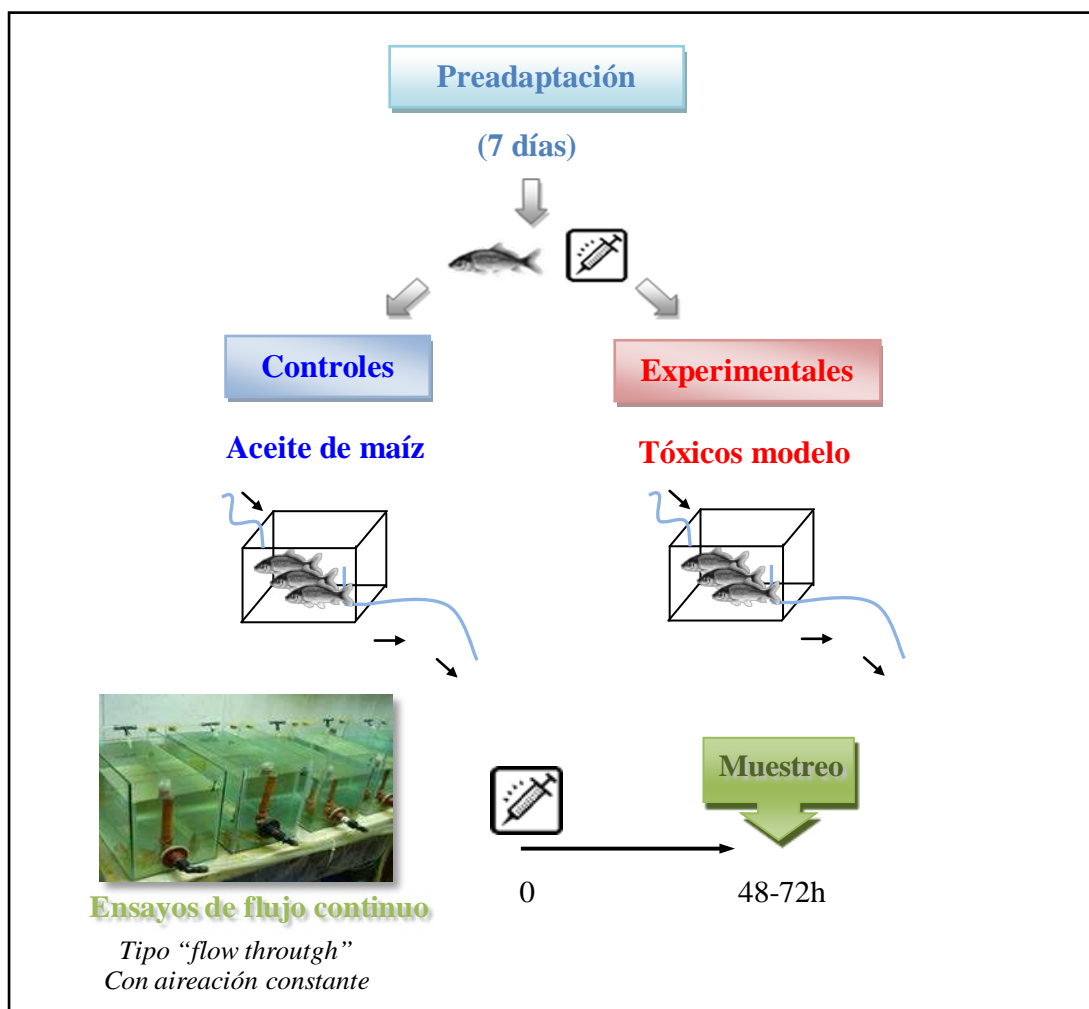


Figura 3.2. Esquema de los bioensayos de laboratorio por medio de una única inyección intraperitoneal.

b- Exposición en agua: Se evaluó el efecto de un HAP por medio de su exposición en agua de red no clorada utilizando dos concentraciones subletales del mismo. Para ello se partió de una solución madre del HAP en acetona pura. Las mismas fueron preparadas en acuarios de 60 L que alimentaban a los acuarios experimentales por medio de una bomba peristáltica multicanal Cole Palmer manteniendo un flujo continuo de 40 ml/min y una renovación diaria de los medios en cada acuario. De acuerdo con diversos autores, esta renovación del tóxico cada 24h permite que las concentraciones del HAP se mantengan durante todo el período experimental (Jifa y col., 2006; Patel y col., 2006). Al mismo tiempo se realizó un control del solvente utilizado para la disolución del tóxico respetando la concentración de acetona máxima utilizada en las soluciones ensayadas (0,05%). Con el

objeto de disminuir la concentración del HAPs en el agua descartada en el sistema de flujo continuo, se confeccionó un sistema para realizar un filtrado previo del agua del ensayo, utilizando piedras, arena y carbón activado que permitieron retener y adsorber este tipo de compuestos orgánicos (Figura 3.3).

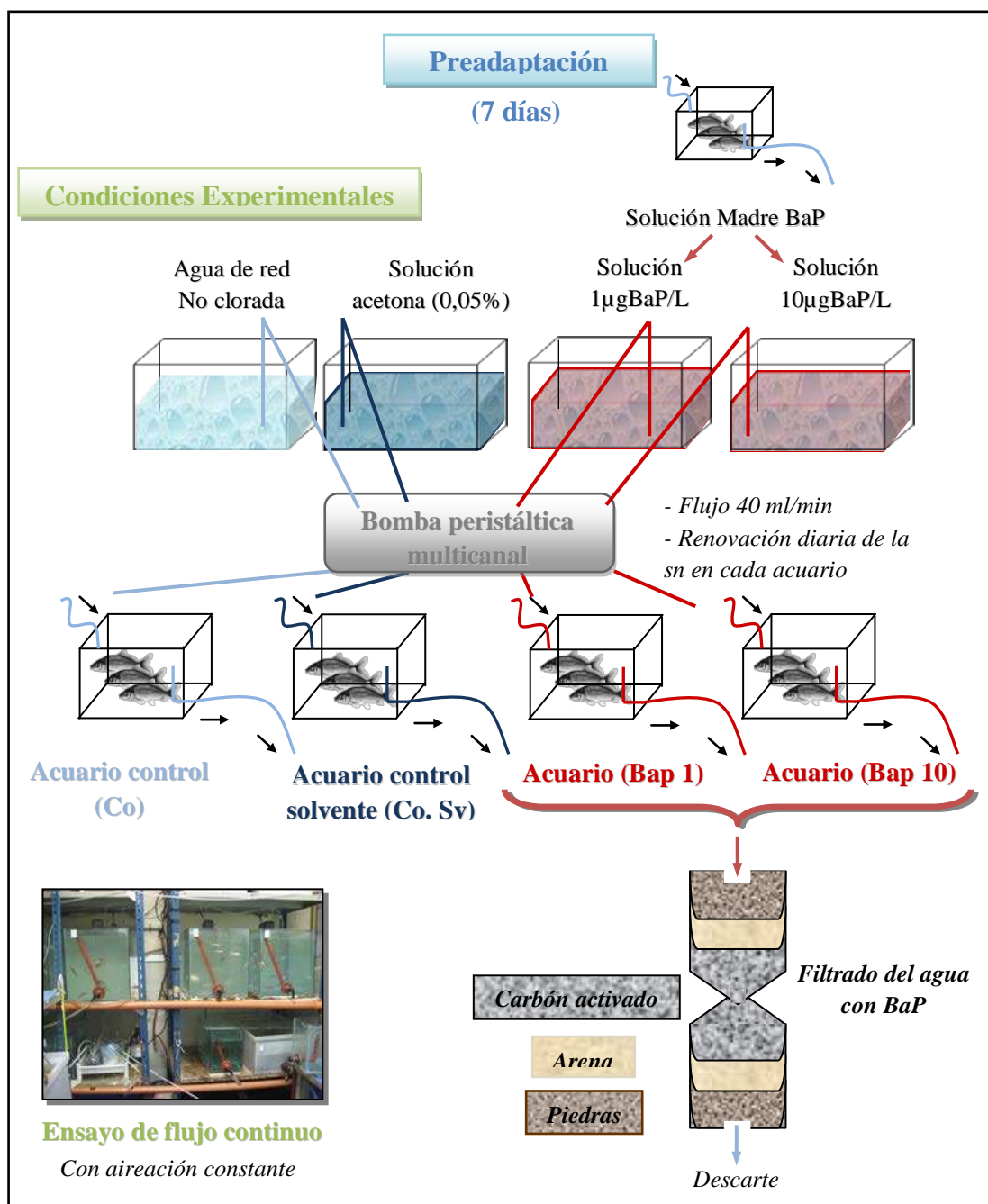


Figura 3.3 Esquema del diseño experimental de los bioensayos de laboratorio por exposición de BaP en agua.

c- *Exposición a sedimento fortificado*: Se evaluó el efecto adverso producido por la exposición a sedimento fortificado con distintos tipos de tóxicos (HAPs, PCBs y compuestos desorganizadores endócrinos) (tipo *spiked*). Para estos ensayos se utilizó el sedimento superficial del arroyo Las Flores, considerado sitio de referencia en este trabajo de tesis debido al escaso impacto antrópico y el cual se encontraba previamente caracterizado por Ronco y col. (2008). En primer lugar se extrajo sedimento de la porción superficial (0-10 cm) del arroyo Las Flores en cantidad suficiente para realizar todos los ensayos tipo *spiked*. Una vez en el laboratorio, el sedimento colectado se procesó manualmente, extrayendo la hojarasca y macrofauna, luego se homogeneizó y se lo dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente el sedimento seco fue molido y pasado por un tamiz de 1000 μm de apertura de malla. En cada ensayo el sedimento de referencia seco fue fortificado con una solución madre de cada tóxico disuelto en 3 ml de acetona pura para análisis. Cada solución madre fue agregada a un inóculo inicial de sedimento en un mortero de vidrio luego se mezcló, homogeneizó y trasvasó a un vaso de precipitados de 1L. Se agregó mas sedimento, repitiendo los pasos anteriores hasta completar el vaso de precipitados mezclando constantemente con una varilla de vidrio. Posteriormente el contenido se fue trasvasando a botellones de vidrio color caramelo hasta completar el total del sedimento a utilizar dejando 1/3 del volumen del botellón libre para un mejor mezclado. Finalmente el sedimento fortificado permaneció mezclándose en forma continua entre 15-30 días en sistema Batch (Figura 3.4 A).

En todos estos ensayos, el diseño experimental incluyó tres condiciones: un acuario con sedimento sin fortificar (control) y dos con sedimento fortificado, uno de los cuales fue considerado como control de la dinámica de cada tóxico ya que no contuvo peces. Se colocó en cada acuario una capa de sedimento y agua de red no clorada en una relación 1:8 para mantener una densidad de carga de 1-2 g/L para cada especie y se dejó estabilizar el sistema durante 24 h. Estos ensayos fueron de tipo estático con un circuito de agua cerrado, con aireación constante y 21 días de exposición (Figura 3.4 B).

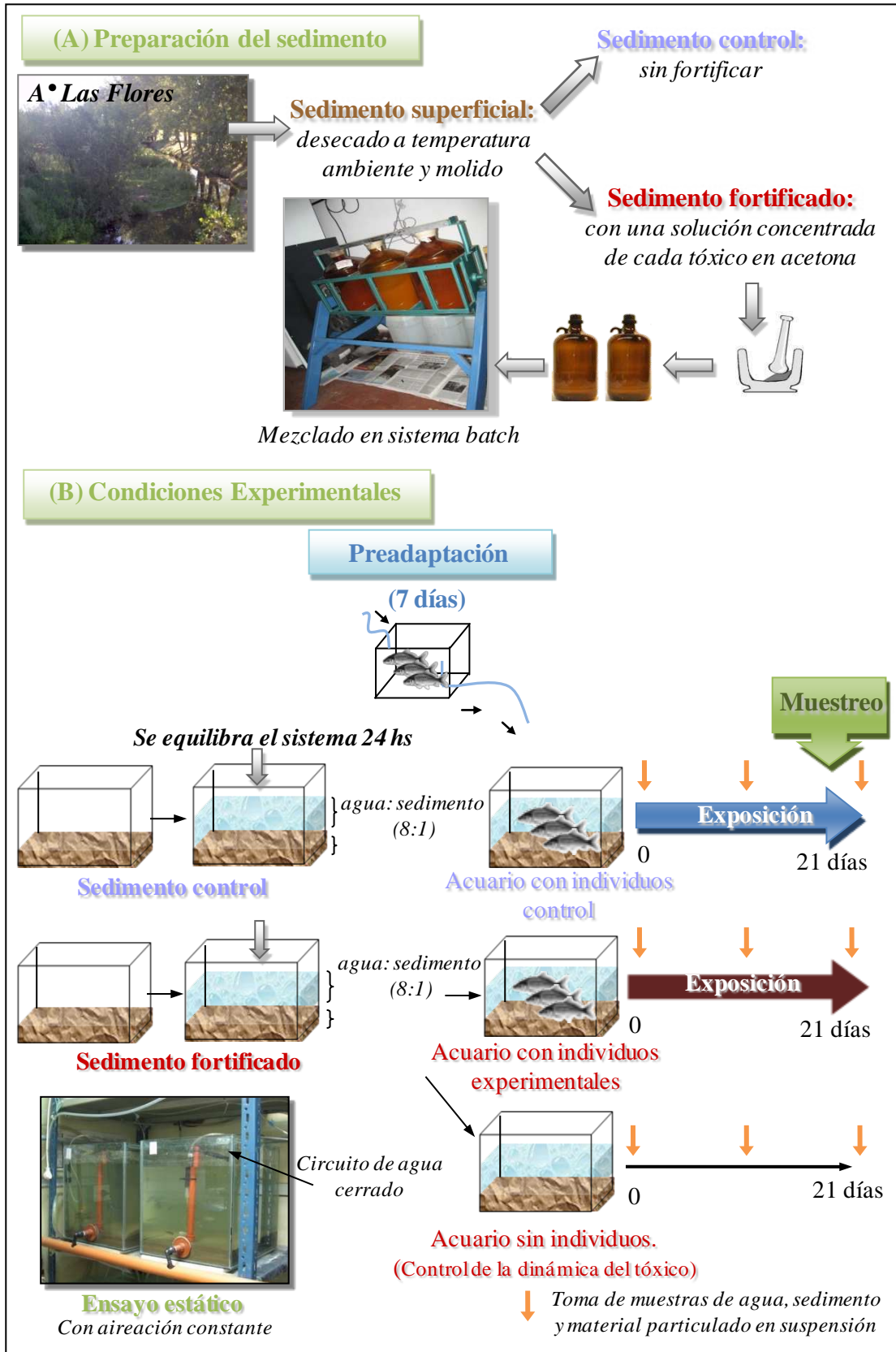


Figura 3.4 Esquema del diseño experimental de los bioensayos de laboratorio por exposición a sedimento fortificado con los diferentes tóxicos. Ensayos tipo *spiked*.

d- Exposición a sedimentos ambientales: Se realizaron ensayos con sedimento superficial de uno de los sitios experimentales propuestos para los ensayos de campo del presente trabajo, Punta Lara (Río de la Plata). Se utilizó como sedimento control el proveniente de la capa superficial del A° Las Flores, el mismo que fue utilizado en los ensayos tipo *spiked*. De ambos sitios se recolectó sedimento de la capa superficial (0-10 cm). El total del sedimento colectado de ambos sitios se proceso manualmente, extrayendo la hojarasca y macrofauna, luego se homogeneizó y se conservó a 4°C durante 24h. Los acuarios fueron preparados con una capa de sedimento húmedo y agua de red no clorada manteniendo una relación 1:8 dejando estabilizar el sistema durante 24 h. El diseño experimental de este ensayo incluyó un acuario experimental y uno control donde los peces permanecieron expuestos durante 21 días al sedimento de Punta Lara y del A° Las Flores respectivamente. El ensayo fue estático con un sistema de agua cerrado y con aireación constante (Figura 3.5).

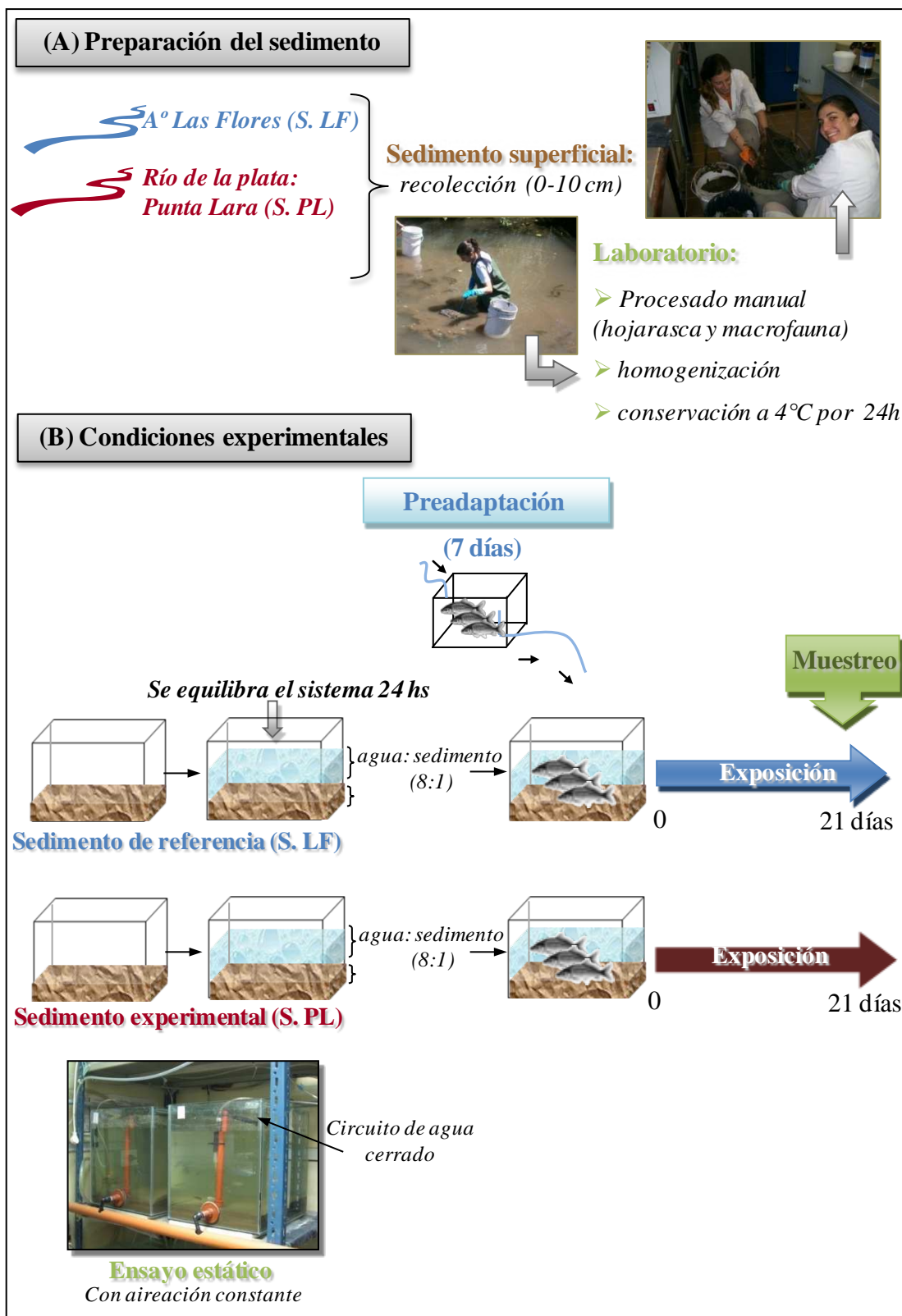


Figura 3.5 Esquema del diseño experimental de los ensayos de exposición a sedimento ambiental (A) tareas de campo y (B) de laboratorio.

3.2.2 Bioensayos de campo

En los bioensayos a campo se evaluó el impacto adverso de la actividad antrópica de los cuerpos de agua en estudio (ver Capítulo 1, sección 1.4) sobre los biomarcadores propuestos luego de la exposición *in situ* con jaulas sumergidas y de la recolección de ejemplares.

a- Exposición in situ: estos ensayos consistieron en la exposición de los organismos prueba en jaulas sumergidas, en el Río de la Plata (zona costera de Punta Lara) y en el tramo medio del Río Luján. Como sitios de referencia se seleccionó el arroyo Las Flores (SR I), tributario del tramo medio del río Luján y el arroyo Durazno (SR II) perteneciente a la cuenca superior del río Reconquista (Figura 3.6). Estudios previos reportaron que el agua superficial del arroyo Las Flores posee un escaso impacto antrópico (Feijoó y col., 1999) y el sedimento está prácticamente libre de contaminantes siendo recomendado el uso del mismo como de referencia para estudios de evaluación de toxicidad de la región (Ronco y col., 2008). A su vez, este arroyo ha sido caracterizado física, química y biológicamente por Di Marzio y col. (2003) quienes consideraron apropiado el uso de este sitio como ambiente “control” o de referencia y como proveedor de individuos de las especies más abundantes allí encontradas para ser utilizadas en ensayos de toxicidad. Por su parte, la cabecera del arroyo Durazno fue propuesto como sitio de referencia debido a su calidad del agua (nutrientes bajos y altos niveles de oxígeno) y a la baja densidad poblacional de la zona (Arreghini y col., 2007). Así mismo, Rigacci y col. (2013) reportaron que el arroyo Durazno es uno de los arroyos de la cabecera del Río Reconquista que presenta mejor calidad de agua, con altos niveles de oxígeno disuelto y baja demanda biológica y química de oxígeno así como la concentración de nutrientes. Las jaulas fueron contruídas utilizando bidones de polipropileno los cuales fueron perforados en todas sus caras con un tamaño de poro de 8 mm de diámetro, permitiendo el flujo de agua. Las jaulas permanecieron aseguradas al fondo por medio de “lastre” a una distancia aproximada de 10 cm sobre la superficie del sedimento. En cada jaula se mantuvo una densidad de carga entre 1-2 g p.c./L (Figura 3.7 A).

b- Recolección de ejemplares: en estos casos se colectaron ejemplares juveniles de especies nativas presentes en la zona de Punta Lara, Río de la Plata y de sitios de referencia (río Paraná-Provincia de Corrientes SR III y arroyo Guayracá SR IV). Se utilizó una red de arrastre de 1,75 m de largo con una apertura de 2,25 m y un copo de 100 cm provisto de una malla de 3,5 mm. Se realizaron varios lances y se seleccionaron ejemplares juveniles de la especie nativa frecuentadora de fondo predominante en el sitio experimental en ese momento (Figura 3.7 B).

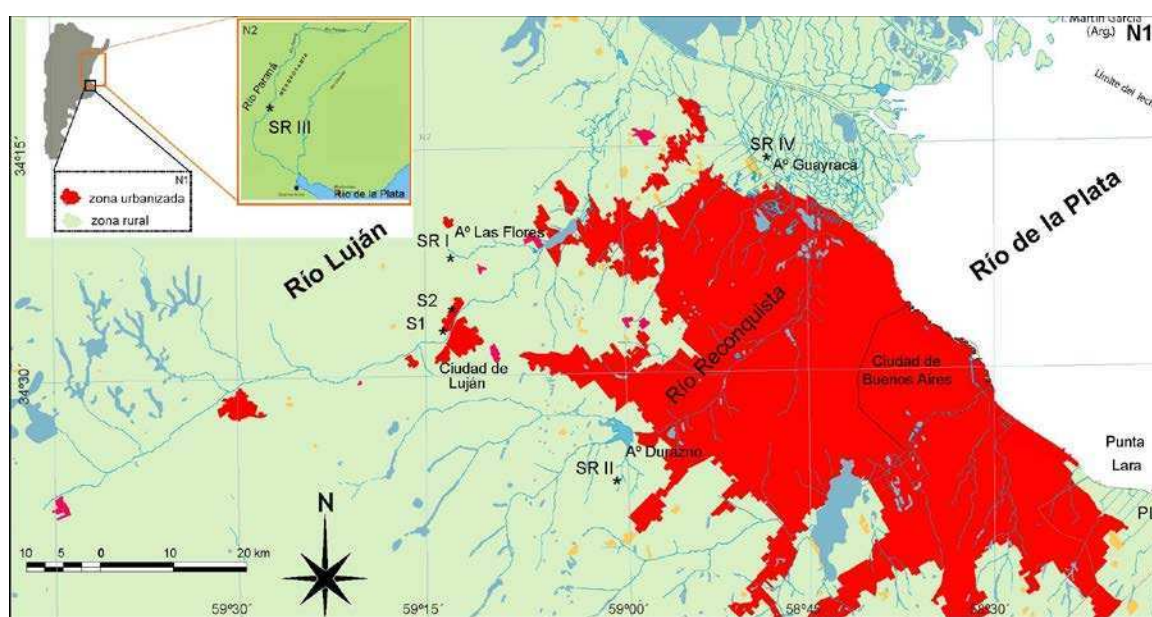


Figura 3.6. Mapa de la cuenca del Río Luján, Río Reconquista y parte del Río de la Plata. **S1** y **S2**, indican la ubicación de los sitios experimentales localizados aguas arriba y abajo de la planta de tratamiento municipal de la ciudad de Luján respectivamente; Punta Lara (**PL**), indica el sitio experimental del Río de la Plata; **SR I** y **SR II**, corresponden a los sitios de referencia de los ensayos *in situ* en el A° Las Flores y A° Durazno respectivamente; **SR III** y **SR IV**, corresponden a los sitios de referencia de los ensayos de recolección en el Río Paraná (Corrientes) y A° Guayracá respectivamente.

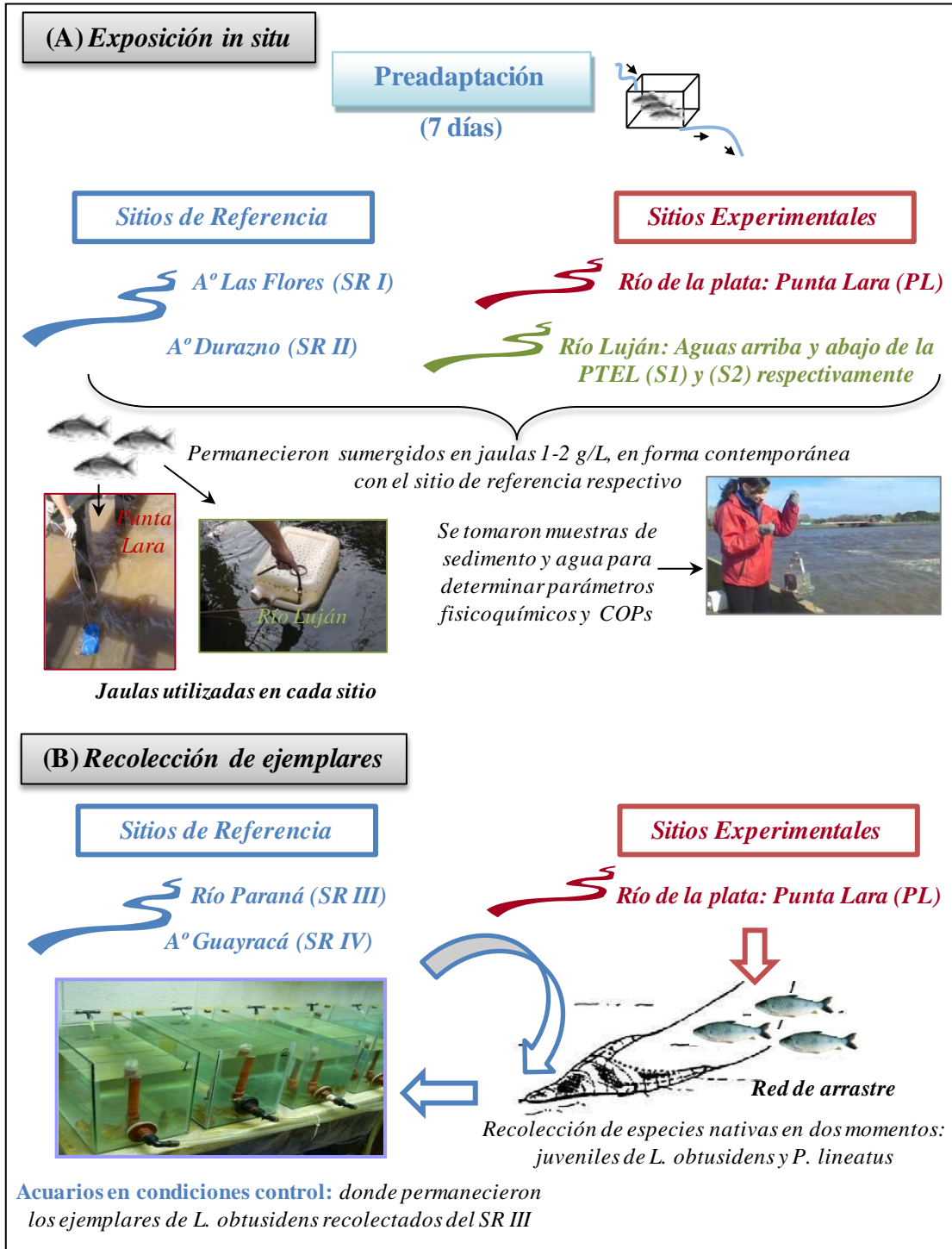


Figura 3.7 Esquema del diseño experimental de los bioensayos de campo (A) *in situ*, (B) de recolección

3.3 Preparación de muestras biológicas

Una vez finalizado cada período experimental los peces fueron extraídos de los acuarios o de las jaulas e inmediatamente llevados al laboratorio para su procesado. Luego se los anestesió utilizando una solución de MS 222 (metanosulfonato de 3-aminobenzoato de etilo. Sigma-Aldrich, USA). Se registró su peso corporal, longitud total y se les extrajo sangre de la vena caudal mediante punción con jeringa de tuberculina (27 G \times 1/2'') previamente heparinizada; a cada muestra de sangre se le agregó 10 μ L de inhibidor de proteasas, *coctel para uso general* (Sigma-Aldrich, USA). Posteriormente se los sacrificó por medio de una incisión en la columna vertebral detrás del opérculo, se accedió a la cavidad peritoneal; se les extrajo el hígado, registrando el peso del mismo y la vesícula biliar evitando su ruptura y recolectándola en microtubos tipo *ependorf*. La sangre se centrifugó a 1000g durante 15 min a 4 °C, el pellet fue descartado, obteniéndose de esta forma el plasma que fue utilizado para la evaluar la presencia de la vitelogenina. Todas las muestras fueron fraccionadas y conservadas a -80 °C hasta el momento de su procesado. Las muestras de hígado fueron homogeneizadas individualmente para obtener la fracción post mitocondrial, con buffer pH 7,4 (0,1M NaH₂PO₄; 0,15M KCl; 1mM EDTA; 1mM DTT; 10% v/v glicerol) utilizando homogenizador de teflón hasta obtener desintegración total del tejido (Nilsen y col., 1998). Los homogenatos obtenidos se centrifugaron a 10000g durante 15 min., a 4 °C, se descartó el pellet y se separó la fracción sobrenadante (FS) para ser utilizada posteriormente en la determinación de los distintos biomarcadores hepáticos (Figura 3.8).

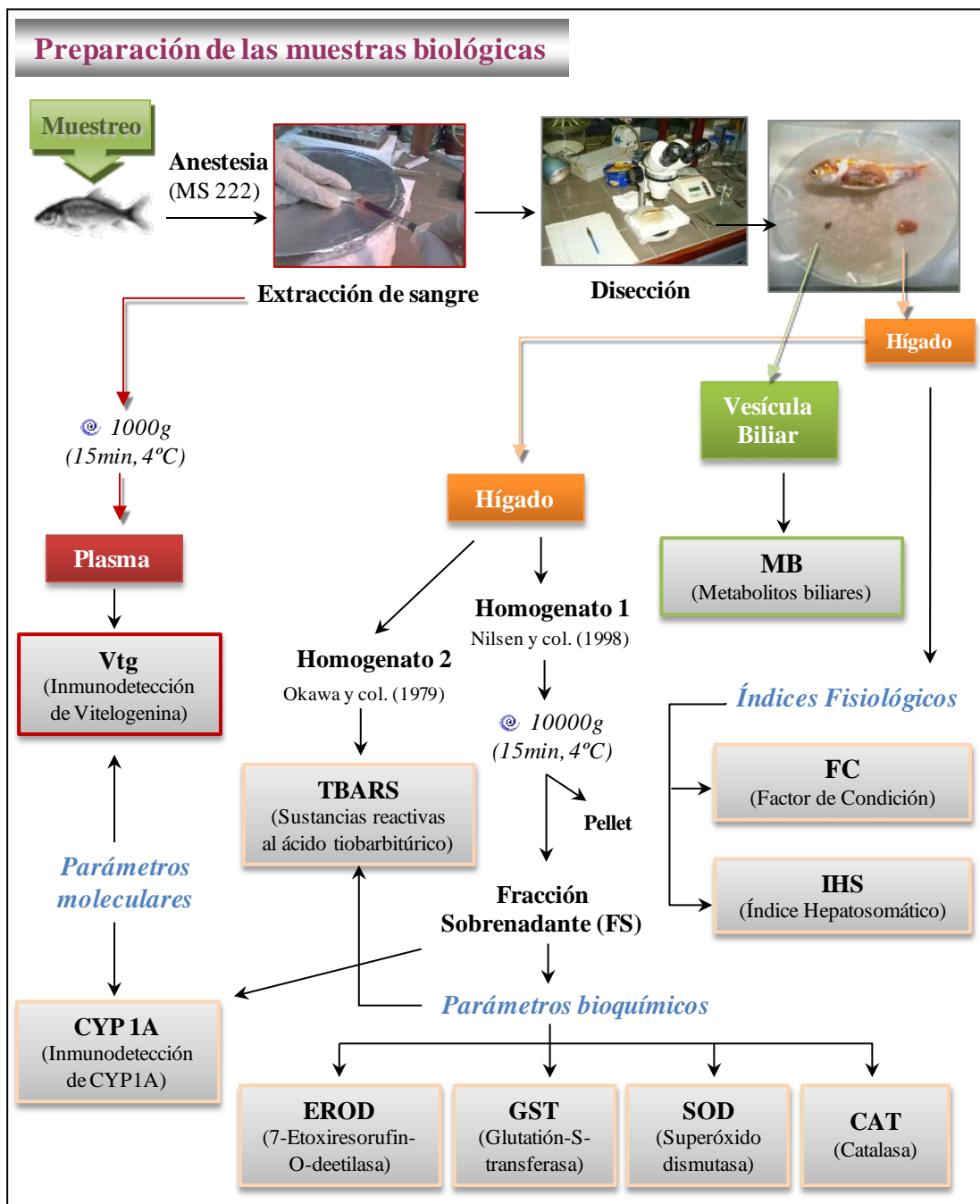


Figura 3.8. Esquema de la preparación de las muestras biológicas y parámetros biomarcadores analizados.

3.4 Parámetros biomarcadores

Se estudiaron los siguientes parámetros biomarcadores fisiológicos, bioquímicos y moleculares en plasma, tejido hepático y vesícula biliar, extraídos de las especies prueba según corresponda.

3.4.1 Índices fisiológicos

- *Factor de condición*

Se determinó el factor de condición (FC) según Bagenal y Tesch (1978) utilizando la siguiente ecuación:

$$FC = [\text{peso corporal (g)} / \text{longitud total}^3 (\text{cm}^3)] \times 100$$

- *Índice hepatosomático*

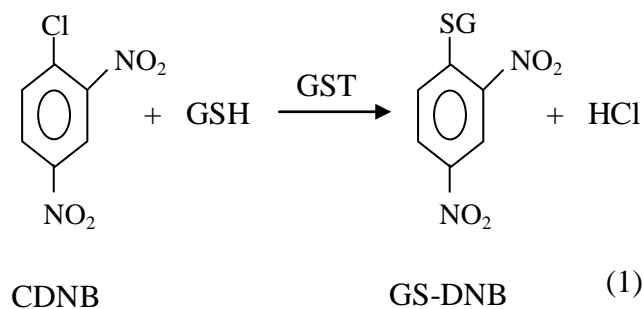
Se evaluó el índice hepatosomático (IHS) de acuerdo con Sloof y col. (1983):

$$IHS = [\text{peso hígado (g)} / \text{peso corporal (g)}] \times 100$$

3.4.2 Asociados a biotransformación

- *Glutación-S-transferasa*

Se determinó la actividad enzimática de la glutación-S-transferasa (GST; EC 2.5.1.18) de acuerdo con Habig y col. (1974), utilizando como sustrato el 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) el cual es conjugado por las diferentes isoformas de la GST en presencia del glutación reducido (GSH) formando GS-dinitrobenzenu (GS-DNB) que se evaluó a una longitud de onda de 340 nm, según la ecuación 1:



Las alícuotas de FS fueron incubadas en buffer fosfato de sodio pH 6,5 (0,1M) conteniendo 10 mM GSH y CDNB 20 mM. La actividad enzimática se expresó como μmoles de GS-DNB formados por minuto por mg de proteínas.

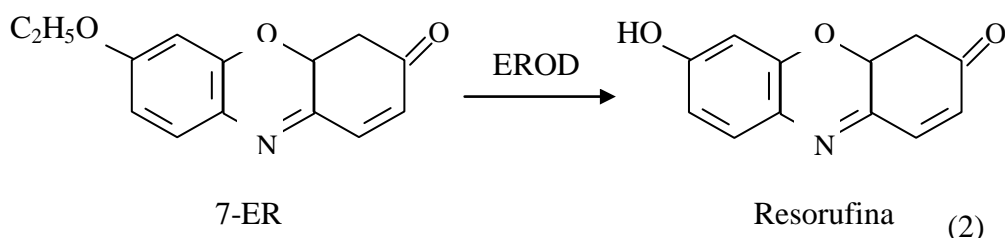
- *Niveles de metabolitos biliares de HAPs*

Se determinaron los niveles de metabolitos biliares (MB) utilizando los métodos de medición de fluorescencia biliar total, a una longitud de onda de excitación/emisión fija (FF) según Lin y col. (1996) modificado. Este método permite estimar la concentración de estos metabolitos sin la necesidad de una separación previa por cromatografía. Inicialmente se realizó una dilución de las muestras de bilis con agua miliQ (1:20) y luego una segunda dilución (1:500) en etanol: agua (50:50 v/v) la cual permite una mejor extracción de los metabolitos (Ariese y col., 1993). Las mediciones FF se realizaron en fluorímetro en la siguiente longitud de onda fija excitación/emisión 380/430 nm para los metabolitos tipo benzo(a)pireno. Se utilizó el metabolito 1-hidroxipireno (1OH-P) como estándar de referencia (Lima y col., 2008), partiendo de una solución madre de 10 mg 1OH-P/L diluido en etanol 50%. La concentración de MB fue expresada como ng 1OH-P por μl de bilis.

- *7-etoxiresorufin-O-deetilasa (EROD)*

Se determinó la actividad catalítica del citocromo P450 1A expresada en términos de la 7-etoxiresorufin-O-deetilasa (EROD) según el método descrito por Lubet y col. (1985) con modificaciones para microplacas (Carriquiriborde, resultados no publicados). La actividad enzimática de la EROD cataliza la O-deetilación del sustrato 7-etoxiresorufina (7-ER)

formando un producto hidroxilado, la resorufina, el cual es evaluado por fluorimetría utilizando una longitud de onda de excitación/emisión de 528/590 nm. La formación de resorufina depende de la presencia de la enzima, del sustrato, de oxígeno y de un cofactor (NADPH) (Ecuación 2):



Las alicuotas de FS fueron incubadas en buffer Tris-HCl (50 mM) con el agregado de MgCl₂ (25 mM), pH 7,5; NADPH 125 μM, 7-ER 0,1 mg/ml de DMSO, se utilizó resorufina como estandar interno. La actividad enzimática se expresó como pmol de resorufina formada por minuto por mg de proteínas.

- *Inmunodetección de la proteína CYP1A*

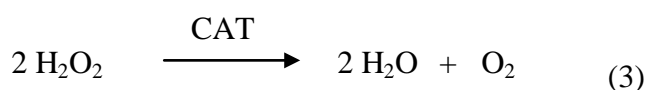
Se evaluó la presencia de la proteína CYP1A por inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales (anti-CYP1Ar), obtenidos previamente, dirigidos contra la proteína CYP1A recombinante de *C. carpio*. Las muestras de FS se resuspendieron con 1 vol. de *buffer* de siembra CB 2X (500 mM 2-mercaptoetanol, 250 mM Tris pH 6,8, 50% glicerol, 10% dodecil sulfato de sodio (SDS), 0,5% azul de bromofenol) y se hirvieron durante 5 minutos. Se prepararon geles de poliacrilamida de 0,75 mm de espesor entre placa de vidrio utilizando un gel concentrador de 5% y un gel separador de 12%, la electroforesis se realizó a 60-80 mA (intensidad de corriente constante), en *buffer* Tris-glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM pH 8,8; glicina 190 mM; SDS 0,1%) (Ausubel y col., 2005). Para el ensayo de *Western blot*, luego de efectuada la electroforesis, se desmontaron los geles de poliacrilamida y se equilibraron con *buffer* de transferencia (Tris-HCl 25 mM, pH 8,8; glicina 190 mM; metanol 20%). Entonces, se cortó una membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro, 0,2 μm) de tamaño semejante al del gel y se sumergió 5 min en *buffer* de transferencia. Posteriormente se procedió al armado del *cassette* de transferencia (Bio-Rad), conteniendo: 1 esponja del tipo *Scotch Brite* (Bio-Rad), 1

papel de filtro *Whatmann* 3MM, el gel de poliacrilamida, la membrana de nitrocelulosa, 1 papel de filtro *Whatmann* 3MM y 1 esponja del tipo *Scotch Brite*. Se montó el *cassette* dentro de la cuba de transferencia (Bio-Rad), se llenó con *buffer* de transferencia y se transfirieron las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa aplicando un voltaje constante de 60 V por 1 h. Se verificó la correcta transferencia proteica sumergiendo la nitrocelulosa en una solución de Rojo Ponceau 0,1% (en acético 5%) durante 5 min y decolorando con agua. Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante toda la noche en *buffer* de bloqueo (TBS-T 0,05%; Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; Tween 20) en leche descremada 5% p/v a 4 °C. La detección de la proteína CYP1A se realizó incubando durante 90 minutos a temperatura ambiente con antisuero de ratón anti-CYP1Ar (anticuerpo primario) diluido en *buffer* de bloqueo (1:2000) (de la Torre y col., 2003). Luego de 3 lavados de 5 minutos con TBS-T las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario comercial conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma A-3562) diluído en *buffer* de bloqueo (1:15000) durante 1 h y posteriormente se realizaron otros 3 lavados de la misma forma. El revelado se realizó con 5 ml de *buffer* de revelado de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM) que contenía 33 µl de nitroazul-tetrazolio (50 mg/ml en dimetilformamida 70%, Gibco) y 16,5 µl de bromo-cloro-indoil-fosfato (60 mg/ml en dimetilformamida 100 %, Gibco). Se incubó al resguardo de la luz hasta la visualización de bandas reactivas. La reacción se detuvo con H₂O y la membrana de nitrocelulosa se secó sobre papel filtro (Figura 3.9).

3.4.3 Asociados a estrés oxidativo:

- *Catalasa*

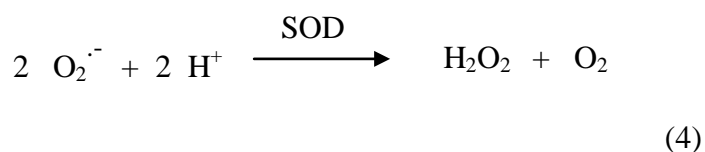
La actividad enzimática de la catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) se determinó siguiendo el método de Beers y Sizer (1952) el cual se basa en la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en el tiempo a una longitud de onda de 240 nm. La reacción que cataliza esta enzima está representada en la ecuación 3:



Las alícuotas de FS fueron incubadas en buffer fosfato de sodio pH 7,2 (50 mM) conteniendo H₂O₂ 20 mM, registrándose los cambios en la absorbancia cada 30 segundos durante 1,5 minutos. La actividad de la CAT fue expresada como μmoles de H₂O₂ consumidos por minuto por mg de proteínas totales.

- *Superóxido dismutasa*

La Superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) cataliza la dismutación de aniones superóxido (O₂^{•-}) en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y oxígeno de la siguiente forma (Ecuación 4):



La determinación de la actividad de esta enzima se basó en el método indirecto que involucra la inhibición de la reducción del citocromo *c*, en el cual este último compite con la SOD por el anión radical superóxido (O₂^{•-}) generado por el sistema xantina/xantina oxidasa (McCord y Fridovich, 1969; Bainy y col., 1996). El medio de reacción estuvo conformado por buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,8, solución de EDTA 100 μM, citocromo *c* 10 μM y xantina oxidasa (50 unidades). Las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 550 nm. Los resultados se expresaron en unidades SOD por mg de proteínas, donde se define 1 unidad (U) SOD como la cantidad de enzima que produce el 50% de inhibición en la reducción del citocromo *c* por minuto (Bainy y col., 1996).

- *Peroxidación lipídica*

La peroxidación lipídica (LPO) fue determinada por medio de la reacción del ácido tiobarbiturico (TBARS) con el malon di-aldehído (MDA) bajo condiciones de acidez y alta temperatura, generando un cromogeno que fue medido por fluorimetría. Se siguió la metodología propuesta por Ohkawa y col. (1979) y Oakes y van der Kraak (2003). De esta forma se tomó una alícuota del hígado de cada individuo y se homogeneizó con KCl 1,15%

conteniendo 35µM de 2,6-di-ter-butilmetilfenol (BHT), en una proporción del 10% P/V. El homogenato 10% fue añadido a la mezcla de reacción conteniendo: 8,1% SDS; ácido acético 20% (pH 3,5); TBA 0,8% y 200 µl BHT, se incubó en un baño termostatzado a 95 °C durante 1h. Luego de enfriar los tubos se agregó agua MiliQ, n-butanol (99.4%) y se mezcló por inversión. Por último, se centrifugó a 2000 g durante 10 min, a 15 °C y se extrajo la capa orgánica y se evaluó por fluorometría con una longitud de onda de excitación de 515 nm (*slit width* 10) y 553 nm de emisión (*slit width* 5) la presencia del cromógeno. La concentración de MDA fue expresada como nmoles TBARS por g de tejido y se usó tetramethoxypropane (TMP) como estándar externo. Cabe mencionar, que con el objetivo de validar la técnica de TBARS se utilizó Fe³⁺ como control positivo de LPO, ya que este metal tiene la capacidad de incrementar la producción de EROs (HO·, H₂O₂) por medio de reacciones del tipo Fenton y Haber-Weiss. Utilizando homogenatos de hígado (10%) de ejemplares de *C. carpio* mantenidos en condiciones estandarizadas de laboratorio descritas en la sección 3.2 (ver Figura 3.1), se realizaron ensayos *in vitro* de inducción de LPO con Fe³⁺. Se incubaron alícuotas de los homogenatos con concentraciones crecientes de Fe³⁺ partiendo de una solución de FeCl₃ (1mM) hasta alcanzar las siguientes concentraciones finales (0, 5, 10 y 50 µM), el control fue incubado con KCl (1,15%). Luego de dos horas de incubación se determinó el contenido de MDA descrito anteriormente. Se registró un importante aumento en los niveles de MDA determinado por medio de TBARS el cual fue dependiente de la concentración de Fe³⁺ ensayada, evidenciando la capacidad de respuesta del tejido hepático de *C. carpio* frente a un agente prooxidante conocido.

3.4.4 Asociados a la presencia de desorganizadores endócrinos

- *Inmunodetección de vitelogenina*

La presencia de vitelogenina (Vtg) en las muestras de plasma se evaluó mediante la técnica de Western blot (Ausubel y col., 2005). A las muestras de plasma (o sus diluciones) conteniendo 40 µg de proteínas totales se les agregó 1/5 del volumen de *buffer* de siembra CB 5X (500 mM 2-mercaptoetanol, 250 mM Tris pH 6,8, 50% glicerol, 10% SDS, 0,5% azul de bromofenol) y luego se hirvieron durante 5 min. Se prepararon geles de 1 mm de espesor entre placa de vidrio utilizando un gel concentrador de 5% y un gel separador de 8%, la

electroforesis se realizó a 60-80 mA, en *buffer* Tris-glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM pH 8,8; glicina 190 mM; SDS 0,1%). Una vez finalizada la corrida electroforética, se desmontaron los geles y las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa por 90 minutos a 100 V en *buffer* de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8,8; glicina 190 mM; metanol 20%) manteniendo la cuba en frío durante todo el proceso. Se verificó la correcta transferencia proteica sumergiendo la nitrocelulosa en una solución de Rojo Ponceau 0,1% (en acético 5%) durante 5 min y decolorando con agua. Posteriormente, las membranas de nitrocelulosa se bloquearon por incubación con una solución de TBS-T 0,05% (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; Tween 20) -leche descremada 5% (*buffer* de bloqueo), durante toda la noche a 4 °C. Para la inmunodetección de Vtg en muestras de plasma se utilizaron alternativamente anticuerpos monoclonales comerciales dirigidos contra Vtg de *C. carpio* (anticuerpo monoclonal, ND-2D3, Biosense Laboratories, Bergen, Norway) o un anticuerpo específico (denominado anti-Vtg-B) obtenido durante este trabajo de Tesis que está dirigido contra un fragmento de la proteína Vtg recombinante de *C. carpio* (ver Anexo). En ambos casos los anticuerpos se diluyeron en *buffer* de bloqueo (relación 1:1000 o 1:4000 respectivamente) y se incubaron con la membrana durante toda la noche a 4 °C en el primer caso o durante 90 minutos a temperatura ambiente en el segundo caso. Luego de 3 lavados de 5 minutos con TBS-T las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario comercial conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma A-3562) diluido en *buffer* de bloqueo (1:15000) durante 1 h y posteriormente se realizaron otros 3 lavados de la misma forma. El revelado se realizó con 10 ml de *buffer* de revelado de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM) que contenía 66 µl de nitroazul-tetrazolio (50 mg/ml en dimetilformamida 70%, Gibco) y 33 µl de bromo-cloro-indoil-fosfato (60 mg/ml en dimetilformamida 100 %, Gibco). Se incubó al resguardo de la luz hasta la visualización de bandas reactivas La reacción se detuvo con agua y la membrana de nitrocelulosa se secó sobre papel filtro (Figura 3.9).

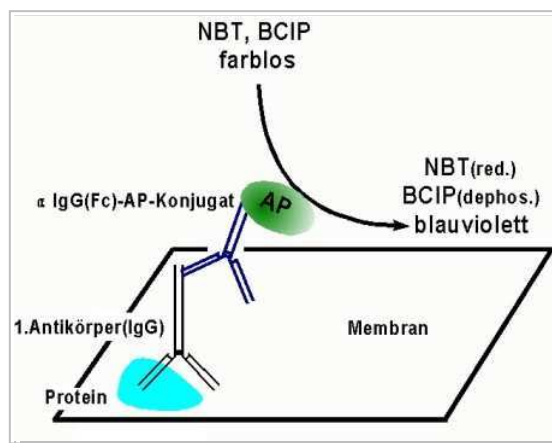


Figura 3.9 Esquema de revelado con fosfatasa alcalina. Se muestra secuencialmente la unión del primer anticuerpo específico (anti-CYP 1Ar o anti-His o anti-Vtg-B) con la proteína de interés, el segundo anticuerpo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina y el revelado con buffer de fosfatasa alcalina conteniendo los sustratos NBT/BCIP.

Cuantificación de proteínas

El contenido de proteínas fue determinado por medio del método de Lowry y col. (1951) utilizando sero-albúmina bovina como estándar de referencia. El contenido de proteínas de cada FS fue utilizado para expresar la actividad específica de las enzimas evaluadas. Al mismo tiempo se midieron las proteínas totales presentes en las muestras de plasma con el objeto de estandarizar la cantidad a sembrar para la detección de Vtg.

3.5 Parámetros fisicoquímicos y determinaciones de COPs en sedimento

Se determinaron parámetros fisicoquímicos básicos del agua superficial del Río Luján, Río de la Plata, de los arroyos utilizados como sitio de referencia y de los acuarios en los ensayos de laboratorio. Las muestras de los ensayos a campo fueron recolectadas y preservadas en frío hasta su procesamiento en el laboratorio. Se determinó el fósforo reactivo soluble, amonio, nitritos, nitratos, dureza y material particulado en suspensión (MPS). Previo a las determinaciones fisicoquímicas las muestras fueron filtradas con filtros de fibra de vidrio Munkell® MF/C (similares a Whatman® GF/C), los cuales fueron prepesados para la determinación de MPS y materia orgánica particulada (MOP). Todas las determinaciones se

realizaron por duplicado siguiendo los procedimientos indicados en APHA (2005). Las curvas de calibración y las diluciones de las muestras se realizaron con agua miliQ. En todas las determinaciones espectrofotométricas las muestras fueron evaluadas utilizando un espectrofotómetro Metrolab 1700.

- *Fosforo reactivo soluble (PRS)*: en medio ácido (H_2SO_4) los iones ortofosfato y molibdato forman ácido molibdofosfórico que en presencia del ácido ascórbico se reduce a azul de molibdeno. Las determinaciones se efectuaron por espectrofotometría a 712 nm y los valores se expresa en $\text{mg P-PO}_4^{-3}/\text{L}$.

- *Amonio (NH_4^+)*: se determinó según el método del fenol, el cual se basa en la formación de un compuesto azulado (indofenol) a partir de la reacción del amonio con hipoclorito y fenol en medio alcalino, catalizada por una sal manganosa. Las determinaciones se efectuaron a una longitud de onda de 690 nm y los valores se expresa en $\mu\text{g N-NH}_4^+/\text{L}$.

- *Nitritos (NO_2^-)*: se realizó por el método de Shinn con sulfanilamida en medio ácido. Este reactivo forma con los nitritos del agua un compuesto complejo que se colorea a violeta-rojizo al agregarle N-1-naftil etilendiamina. Las determinaciones se realizaron a una longitud de onda de 543 nm y los valores se expresa en $\text{mg N-NO}_2^-/\text{L}$.

- *Oxígeno disuelto (OD)*: se determinó por medio del Método iodométrico de Winkler, en el cual, los iones manganeso (II) reaccionan en el medio alcalino con el oxígeno disuelto, oxidando los hidróxidos de manganeso formados a valencias mayores (III). En medio fuertemente ácido los iones manganeso (III) oxidan el yoduro a I_2 en cantidad equivalente al oxígeno disuelto; éste último se titula con una solución de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) y el manganeso vuelve a su estado divalente.

Las muestras de agua fueron colectadas en campo y/o en el laboratorio según corresponda con botellas de vidrio de 50 ml con tapa esmerilada y se fijó el OD en la muestra, evitando cambios en la cantidad del mismo ocasionados por la actividad biológica o por intercambio con la atmósfera, para lo cual se agregaron 0,5 ml de MnSO_4 y 0,5 ml de solución iodada (50% p/v NaOH, 15% KI, 1% NaN_3), se agitó y dejó reposar 1 minuto. Posteriormente se agregó 0,5 ml de H_2SO_4 concentrado y se agitó nuevamente. Se tomó una alicuota de 20 ml, se agregaron unas gotas de almidón y se homogeneizó, la solución desarrolla una coloración

violacea proporcional al contenido de oxígeno. Luego se procede a la titulación con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,01N) hasta que vira de color azul a incoloro. La concentración de oxígeno en la muestra (en mg/L) se determinó según la siguiente fórmula:

$$\text{O}_2 = \frac{V_g * N_v * F * 8000}{V_e * (V_{\text{bot}} - 1)/V_{\text{bot}}}$$

V_g = volúmen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastado

N_v = normalidad de la solución tituladora ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)

V_{bot} = volúmen de la botella

V_e = volúmen transvasado al elermeyer

- *Material particulado en suspensión (MPS)*: se determinó filtrando la muestra ($V_{\text{filtrado}} \geq 150$ ml) con filtros de fibra de vidrio Munkell[®] MF/C calcinados y prepesados (PF). Luego el filtro se secó en estufa a 60°C hasta peso constante para obtener el peso seco (PS= $P_{60^\circ\text{C}}$ - PF). Posteriormente el filtro se calcinó en mufla a 480°C durante 4 horas, se lo dejó llegar a temperatura ambiente en desecador y se determinó el peso seco inorgánico (PSI= $P_{480^\circ\text{C}}$ - PF). El peso seco orgánico (peso seco libre de cenizas) se calculó por diferencia de los dos anteriores (PSO= PSI - PS). Todas las pesadas fueron realizadas con una balanza analítica Mettler +/-0,0001g. Los resultados se expresan en mg/L.

Por su parte, en los ensayos a campo se midieron *in situ* los siguientes parámetros: temperatura, pH, OD y conductividad del agua por medio de electrodos de campo Hach multi-sonda HQ40d (pH C101, LDO 101, CDC 401).

En los ensayos con sedimento fortificado tipo *spiked* y en los ensayos en campo en el Río de la Plata se tomaron muestras de sedimento superficial donde se determinaron las concentraciones de los diferentes COPs según corresponda. Las muestras fueron homogeneizadas, secadas a temperatura ambiente y almacenadas a -20 °C hasta ser requeridas para su análisis. Se determinaron las concentraciones efectivas de BaP, NP, PCBs y se evaluó el perfil de HAPs, PCBs y POCs según corresponda. La metodología empleada en cada una

de estas determinaciones se detalla en el capítulo correspondiente (Capítulos 4, 5, 6 y 8). Al mismo tiempo, se determinó la composición granulométrica y el contenido de materia orgánica (MO) de los sedimentos mencionados anteriormente.

- *MO y Granulometría*: el contenido de MO fue determinado por pérdida por ignición en mufla a 480 °C durante 4h. La composición granulométrica se determinó por tamizado y el método de la pipeta para partículas finas (Depetris, 1995). En cada muestra de sedimento (50 g) previamente muflada se adicionó 100 ml de solución dispersante (Hexametáfosfato de sodio, $\text{Na}_6(\text{PO}_3)_6$; solución de calgón al 5%) permaneciendo en agitación durante 24h. Se separó la arena en su conjunto de la fracción limo-arcillosa mediante tamiz de 53 μm de apertura de malla, la fracción fina se colectó en probeta de 1000 ml. La fracción fina se separó por medio del método de la pipeta, el cual se basa en la velocidad de asentamiento de las partículas en medio acuoso y consiste en tomar sucesivamente una cantidad fija de suspensión por medio de una pipeta graduada a distintas profundidades y distintos tiempos. Cada fracción fue vertida en cristalizadores (previamente secados y pesados) y secada en estufa hasta peso constante. Los cálculos se realizaron mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Arena total (g)} = \text{Peso seco total}$$

$$\text{Finos (Limo + arcilla en g)} = (\text{peso total fracción1} - 0,02) * 50$$

$$\text{Arcilla (g)} = (\text{peso total fracción2} - 0,02) * 50$$

$$\text{Limo (g)} = \text{Finos} - \text{Arcilla}$$

Posteriormente se separó la arena fina de mediana y gruesa, utilizando un tamíz de 250 μm de apertura de malla y se pesaron ambas fracciones por separado. Finalmente cada fracción fue expresada en forma porcentual (%).

3.6 Análisis estadístico

Se analizó la normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos por medio del *test* de Kormogorov-Smirnov y el de Levene. Los resultados obtenidos se analizaron mediante métodos paramétricos, los datos que no cumplieron con estos requerimientos se ajustaron por medio de transformaciones logarítmicas para lograr su normalidad. Las diferencias estadísticas entre grupos fueron determinadas por medio del *test t*

de Student, ANOVA de una o dos vías seguido por la prueba de Tukey de comparaciones múltiples según corresponda (Zar, 1996).

Se realizó un análisis multivariado con el objeto de analizar la existencia de diferencias significativas entre los grupos experimentales de los ensayos realizados en campo, *in situ* y en laboratorio con sedimentos ambientales de los sitios de estudio (Capítulo 7). Para esto se utilizó el análisis discriminante canónico, utilizando como variables los parámetros biomarcadores.

Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando los paquetes estadísticos Sigma Stat y Statistica, los gráficos se realizaron con el software para Windows GraphPad Prism 5.

Las respuestas de los parámetros biomarcadores evaluados se combinaron para la elaboración de un índice general de estrés denominado IBR, del inglés *Integrated biomarker response* según ha sido propuesto por Beliaeff y Burgeot (2002) (Capítulo 9). Este índice fue elaborado para comparar e integrar las respuestas de los biomarcadores en los ensayos de laboratorio y de campo *in situ*. Los biomarcadores utilizados para el cálculo del IBR fueron GST, CAT, SOD y TBARS. En primer lugar los datos fueron estandarizados para las comparaciones visuales directas de las respuestas de biomarcadores para cada sitio experimental (en ensayos *in situ*) y para cada tratamiento (en ensayos de laboratorio). Los datos estandarizados (Y) se calcularon de la siguiente manera:

$$Y = (X - m) / s$$

donde X = valor de la respuesta de cada parámetro biomarcador,

m = media general de cada parámetro biomarcador, teniendo en cuenta los valores de

X para cada sitio o tratamiento experimental,

s = desvío estándar de cada parámetro biomarcador.

Luego se obtuvo el valor mínimo (*min*) para cada biomarcador a partir de los datos estandarizados (Y). Por último, el *score* (S) se calcula como $S = Y + |min|$, donde $S \geq 0$ y $|min|$ es el valor absoluto. Para visualizar los resultados se utilizaron los gráficos de estrella (*start plots*), los cuales fueron realizados con el software EXCEL (Microsoft Office). Cada uno de los parámetros biomarcadores estandarizados fue representado gráficamente como un

vector en el gráfico de estrella, cuando S_i y S_{i+1} representan los *scores* de los parámetros biomarcadores consecutivos el IBR es definido por el área encerrada en el polígono formado por la unión de todos los vectores. Al mismo tiempo, el valor del IBR se estimó mediante el procedimiento propuesto por Beliaeff y Burgeot (2002) de la siguiente manera:

$$\text{IBR} = [(S_i * S_{i+1})/2 + (S_{i+1} * S_{i+2})/2 + (S_{i+2} * S_{i+3})/2 + (S_{i+3} * S_i)/2]$$

CAPÍTULO 4

Efecto de hidrocarburos aromáticos policíclicos sobre las respuestas de los biomarcadores de las especies prueba: exposición en diferentes matrices.

4.1 Introducción

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), son un grupo de sustancias químicas con similar estructura y composición que contienen dos o más anillos de benceno fusionados. Los HAPs pueden ser diferenciados en dos grandes grupos: los de menor peso molecular, aquellos con 2 o 3 anillos aromáticos en su estructura y los de alto peso molecular con 4 a 7 anillos aromáticos, algunos de los cuales se los conoce por su efecto carcinogénico. Las estructuras químicas de algunos HAPs comúnmente estudiados se indican en la Figura 4.1. En estado puro son sólidos a temperatura ambiente, incoloros, blancos o amarillo-verde pálido, son semivolátiles, solubles en diversos solventes orgánicos y prácticamente insolubles en agua, esto último se incrementa con el aumento del peso molecular. Las fuentes de ingreso de estos compuestos al medio ambiente pueden ser de origen natural como los incendios forestales, de pastizales, erupciones volcánicas, filtraciones de petróleo, etc; así como de origen antropogénico por ejemplo la quema de combustibles fósiles, la incineración de residuos sólidos urbanos, madera, los derrames y descargas de petróleo (Haritash y Kaushik, 2009). Algunos HAPs han sido clasificados como poluentes prioritarios tanto por la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU (USEPA) como por la Unión Europea, 16 de estos compuestos fueron designados de interés ambiental y 6 de los mismos se los conoce como posibles o probables compuestos carcinógenos en humanos: benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno y el indeno(1,2,3-cd)pireno (Figura 4.1) (Barra y col., 2007).

El metabolismo de los HAPs ha sido muy estudiado en peces ya que son contaminantes comúnmente encontrados en el ambiente acuático y por su condición carcinogénica en peces y otros vertebrados superiores (Schlenk y col., 2008). La β -naftoflavona (BNF) es un análogo sintético de una serie de compuestos flavonoides encontrados naturalmente, es un HAPs modelo que puede ser utilizado para evaluar procesos de biotransformación en organismos acuáticos.

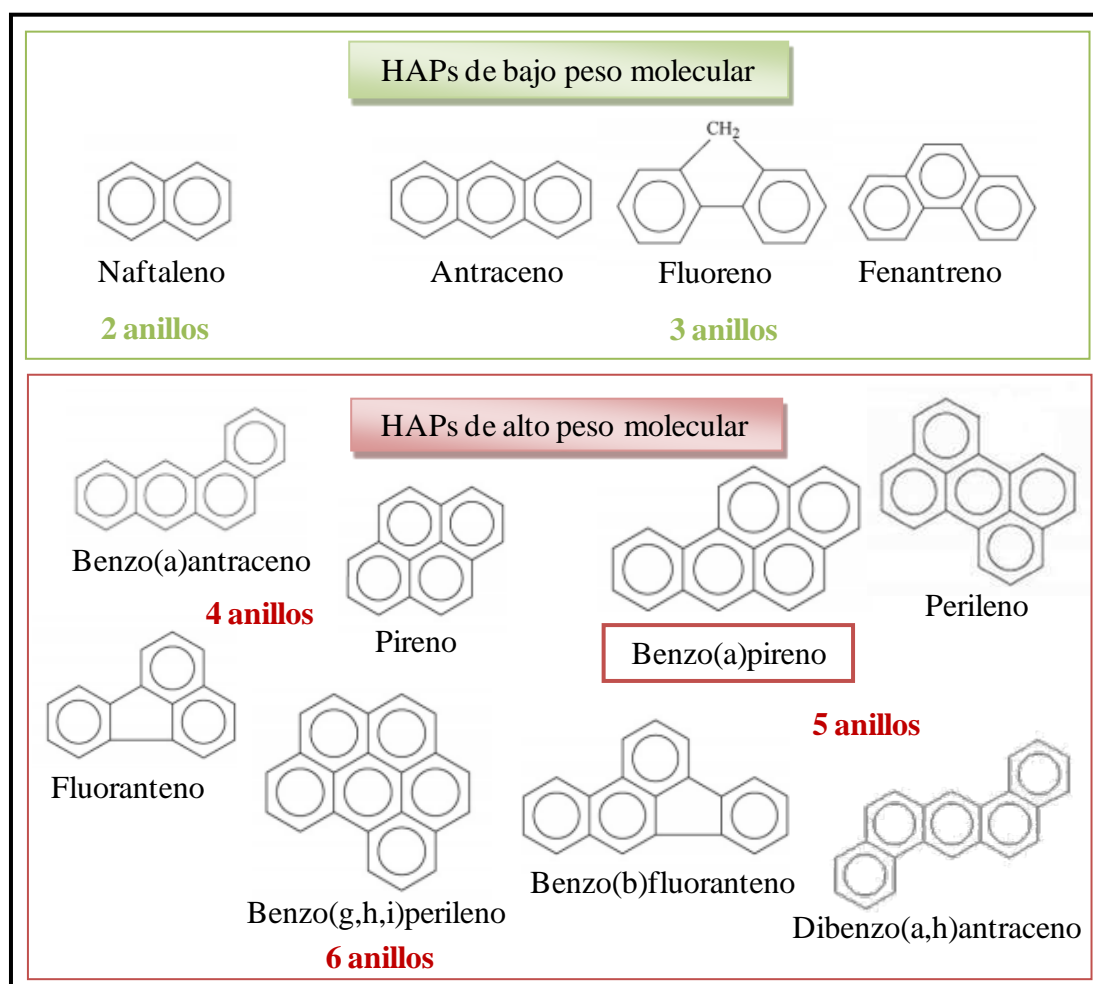


Figura 4.1. Estructura química de algunos HAPs comúnmente estudiados. (Haritash y Kaushik, 2009)

El benzo(a)pireno (BaP) es uno de los HAPs más ubicuos, liberado y distribuido en el medio ambiente como consecuencia de su formación durante la combustión de la materia orgánica. Dichos aportes se deben principalmente a las actividades antrópicas como la combustión de combustibles fósiles, emisiones de hornos de coque y escapes de automóviles. La principal fuente de BaP en aguas superficiales es la deposición atmosférica directa, la cual es proporcional a la superficie del cuerpo de agua. Se ha demostrado que el BaP induce marcados efectos moleculares, celulares y es considerado como el HAPs carcinogénico modelo. Este compuesto no es carcinogénico por sí mismo, pero se vuelve tal durante el proceso de biotransformación ya que los metabolitos reactivos forman aductos de bases de ADN, iniciando el proceso de mutagénesis y carcinogénesis. Por lo tanto, el BaP ha recibido especial atención y ha servido como modelo para entender mejor el proceso de

biotransformación de los HAPs (Schlenk y col., 2008). El metabolismo o biotransformación del BaP, como el de otros HAPs, se produce a través de dos fases (fase I y II). En la Figura 4.2 se ilustra las posibles rutas de biotransformación del BaP. El metabolismo de fase I, involucra la acción de oxidadasas y la formación de diol-epóxidos. Un ejemplo de oxidada que está asociada con la biotransformación de HAPs es el citocromo P450 y en particular, la subfamilia CYP1A representa la isoforma principal que participa activamente en el metabolismo oxidativo del BaP en la mayoría de las especies incluidos los peces. El metabolismo de fase II incluye la conjugación con intermediarios como el glutatión a través de la glutatión-S-transferasa (GST), sulfatos y ácidos mercaptúrico o glucurónico. Los conjugados formados son más solubles en agua que el compuesto original, lo cual permite su rápida excreción a través de vesícula biliar. El metabolismo oxidativo del (BaP) dependiente del citocromo P450 conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), entre las cuales podemos mencionar al anión superóxido y peróxido de hidrógeno.

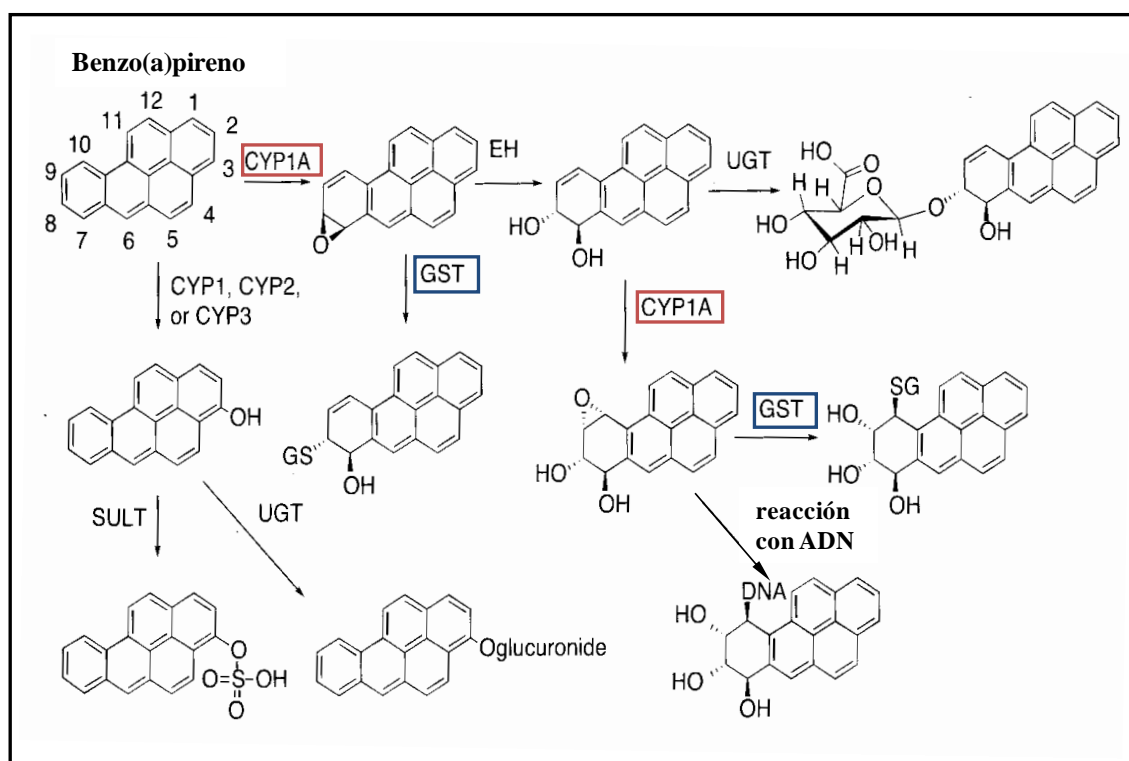


Figura 4.2 Rutas de biotransformación del benzo(a)pireno (BaP). Tomado de Schlenk y col. (2008).

En este trabajo se seleccionó el BaP como HAP característico de ser encontrado en el ambiente y así evaluar su efecto luego de su exposición por medio de diferentes matrices (agua y sedimento) asemejando condiciones que pudieran ocurrir en el ambiente acuático. Por su parte, los efectos biológicos provocados por estas sustancias son susceptibles de ser evaluados mediante parámetros biomarcadores utilizando peces como organismos prueba.

4.1.1 Hipótesis y Objetivos

Hipótesis:

La exposición de las distintas especies prueba a los HAPs (β -naftoflavona y benzo(a)pireno) promueve una respuesta diferencial de los biomarcadores hepáticos propuestos prevaleciendo principalmente aquellas relacionadas con la biotransformación.

La exposición del BaP por medio de diferentes matrices induce de forma diferencial el sistema del citocromo P450 del hígado de las especies prueba debido a las diferentes vías de ingreso de los tóxicos que predominan en cada caso.

Objetivos:

1. Estudiar el efecto de hidrocarburos aromáticos policíclicos (β -naftoflavona y benzo(a)pireno) como inductores específicos de respuesta del sistema citocromo P450 1A, en particular sobre la expresión de la proteína CYP1A y su actividad catalítica EROD.
2. Evaluar y comparar las respuestas de los biomarcadores propuestos en las especies prueba frente a un HAP que puede estar presente en el ambiente, el benzo(a)pireno, luego de su exposición intraperitoneal, disuelto en agua y en sedimento fortificado.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Bioensayos de intoxicación con HAPs

Se evaluó el efecto de un HAP modelo, la β -naftoflavona (BNF) y de un HAP que puede estar presente en el ambiente acuático, el benzo(a)pireno (BaP) sobre la respuesta de los biomarcadores. El efecto de la BNF se evaluó luego de una exposición aguda por medio de una inyección intraperitoneal y se utilizó como control positivo de la inducción del citocromo P450 1A.

4.2.1.1 Inyección intraperitoneal

Estos ensayos fueron del tipo *flow through* y se realizaron bajo condiciones estándar con un fotoperíodo 12/12h D/N y temperatura ($20 \pm 1^\circ\text{C}$). Los tóxicos fueron administrados por medio de una única inyección intraperitoneal disueltos en aceite de maíz como se detalló en la sección 3.2.1. Luego de 48 h de exposición los peces fueron sacrificados y procesados como se detalla en el Capítulo 3 (ver sección 3.3).

El efecto de la BNF se evaluó utilizando una dosis subletal de 50 mg BNF /kg p.c. seleccionada en base a los estudios de Washburn y col. (1996) y a estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Ascar, 2006). Estos ensayos se realizaron con ejemplares juveniles de *Cyprinus carpio* con un p.c. de $5,6 \pm 0,2$ g y una longitud total de $7,7 \pm 0,1$ cm (media \pm ESM; $n=15$) y con la especie nativa *Corydoras paleatus* con un p.c. de $2,9 \pm 0,1$ g y una longitud total de $5,3 \pm 0,1$ cm (media \pm ESM; $n = 20$).

Para evaluar el efecto del BaP se empleó una dosis subletal de 10 mg BaP/kg p.c., la cual fue seleccionada en base a bibliografía (Padrós y col., 2000; Bonacci y col., 2003; Malmström y col., 2004). Se utilizaron ejemplares juveniles de *Cyprinus carpio* como especie prueba con un p.c. de $6,7 \pm 0,6$ g y una longitud total de $7,9 \pm 0,2$ cm (media \pm ESM; $n=10$).

4.2.1.2 Exposición en agua

Se evaluó el efecto del BaP por medio de su exposición en agua de red no clorada, utilizando dos concentraciones subletales de BaP. Para ello se preparó una solución madre de BaP en

acetona pura con una concentración de 20 mg BaP/L, las concentraciones evaluadas fueron de 1 y 10 µg BaP/L de agua de red no clorada, las cuales fueron preparadas como se describió en la sección 3.2.1. Las concentraciones de BaP en agua y el tiempo de exposición fueron seleccionados en base a lo propuesto por Patel y col. (2006) y Vieira y col. (2008). Luego de dos semanas de aclimatación como se describe en el capítulo 3 los peces fueron divididos en cuatro grupos y asignados al azar a los distintos acuarios experimentales:

- Grupo 1, peces expuestos a 10 µg BaP/L de agua (BaP 10)
- Grupo 2, peces expuestos a 1 µg BaP/L de agua (BaP 1)
- Grupo 3, peces expuestos a una solución de acetona 0,05 % v/v (Co. Sv)
- Grupo 4, peces expuestos al agua de red no clorada (Co)

Las condiciones experimentales fueron constantes a lo largo de todo el período de exposición, el fotoperíodo fue fijado en 12/12 h (D/N), la temperatura en los acuarios fue de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, la aireación fue constante y se los alimentó una vez al día con el 1% del p.c. (ver capítulo 3).

Estos ensayos se realizaron con la especie prueba estandarizada y la especie nativa *Pimelodella laticeps*. Ejemplares juveniles de *C. carpio* con un p.c. de $11,1 \pm 0,4$ g (media \pm ESM; $n = 31$) permanecieron expuestos durante 14 días, con una densidad de carga de 1,6 g/L por acuario. Al mismo tiempo, ejemplares de *P. laticeps* con un p.c. de $3,7 \pm 0,1$ g (media \pm ESM; $n = 80$) permaneciendo durante 7 y 14 días en exposición, manteniendo una densidad de carga de 1,8 g/L por acuario. En este caso se consideró además un tiempo de exposición menor para evaluar la existencia de respuestas tempranas en la especie nativa. Al finalizar el período experimental los peces fueron sacrificados y procesados como se indica en el Capítulo 3 (ver sección 3.3).

4.2.1.3 Exposición a sedimento fortificado

Se evaluó el efecto adverso producido por la exposición a sedimento fortificado (tipo *spiked*) con BaP. Para estos ensayos se utilizó el sedimento superficial del arroyo Las Flores, el cual fue extraído y procesado como se describió en el Capítulo 3 (ver sección 3.2.1). El sedimento fue fortificado utilizando una solución madre de BaP en acetona (2,67 mg BaP/ml) para lograr

una concentración teórica de 1,3 mg BaP/kg p.s. de sedimento. La concentración de BaP utilizada fue seleccionada en base a bibliografía y a concentraciones reportadas en el ambiente (CCME, 1999-2002; Colombo y col., 2006). Estos ensayos se realizaron con juveniles de *Cyprinus carpio* con un p.c. de $5,5 \pm 0,2$ g (media \pm ESM; $n = 20$) y de la especie nativa *Hoplosternum littorale* con un p.c. de $18,0 \pm 1,1$ g (media \pm ESM; $n = 16$), los mismos fueron de tipo estático con aireación constante y 21 días de exposición. El diseño experimental utilizado fue descrito en el Capítulo 3 (ver Figura 3.4). Los peces fueron divididos al azar en los diferentes acuarios manteniendo una densidad de carga de 1,3 g p.c./L para *C. carpio* ($n=10$) y 2 g p.c./L para *H. littorale* ($n=8$). En tres momentos diferentes de los ensayos (inicio, mitad y fin) se tomaron muestras de agua donde se midieron parámetros fisicoquímicos básicos, material particulado en suspensión y muestras de sedimento donde se midieron las concentraciones efectivas del tóxico.

4.2.2 Parámetros evaluados

4.2.2.1 Parámetros biomarcadores

Se determinaron los índices fisiológicos (FC e IHS) tal como fueron descritos en la sección 3.4.1. Se evaluaron los biomarcadores asociados a la biotransformación como la actividad enzimática de GST, la inmunodetección de la proteína CYP1A así como su actividad catalítica por medio de la EROD y se determinaron los niveles de metabolitos biliares del BaP según han sido descritos en la sección 3.4.2. Por último de los parámetros asociados al estrés oxidativo se evaluó la actividad enzimática de la CAT y SOD así como los niveles de TBARS siguiendo las condiciones ya descritas en la sección 3.4.3.

4.2.2.2 Parámetros fisicoquímicos y determinación de HAPs en sedimento

Se registraron los parámetros fisicoquímicos básicos del agua de los acuarios a partir de muestras tomadas en al menos dos oportunidades a lo largo del período experimental. Se determinó el pH, la conductividad y el oxígeno disuelto (OD) así como la concentración de amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y fósforo reactivo soluble (PRS) mediante las técnicas especificadas en la sección 3.5. En los ensayos con sedimento también se evaluó el contenido

de materia orgánica particulada (MOP) y el material particulado en suspensión (MPS) según han sido descritas en la sección 3.5. Por último se determinaron las concentraciones efectivas del BaP en sedimento y MPS, por cromatografía gaseosa con detector de masa (GC/MS) en el laboratorio de Microcontaminantes acuáticos de la Universidad Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil (Niencheski y Fillmann, 2006) (ver capítulo 7). Los resultados se presentan como concentraciones medias de BaP en sedimento, MPS y como cantidades (masa) de BaP para los distintos sistemas experimentales, teniendo en cuenta los niveles de MPS y la cantidad de sedimento en el sistema (acuario).

4.2.3 Análisis estadístico

En los ensayos de inyección intraperitoneal las diferencias estadísticas entre grupos se evaluaron mediante el *test t* de Student ($p < 0,05$). En los ensayos de exposición en agua las diferencias se evaluaron por medio de ANOVA de un factor y las comparaciones múltiples entre los distintos grupos experimentales se analizaron con el *test* de Tukey ($p < 0,05$). Por su parte, en los ensayos de exposición a sedimento fortificado se utilizó ANOVA de dos factores evaluando las diferencias entre los ejemplares expuestos a BaP y los expuestos al sedimento control y al mismo tiempo las diferencias entre especies prueba, seguido por la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

4.3 Resultados

No se observó mortalidad durante el período experimental de ninguno de los ejemplares en los ensayos realizados, confirmando que las dosis y concentraciones de los tóxicos ensayados fueron subletales para los ejemplares de las distintas especies.

4.3.1 Inyección intraperitoneal

Con β -naftoflavona

Tanto en el ensayo realizado con *Cyprinus carpio* como con *Corydoras paleatus* en condiciones estándar de laboratorio no se observaron diferencias significativas en los índices

fisiológicos de ninguna de las dos especies luego de la intoxicación con 50 mg/kg p.c. de BNF (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Índices fisiológicos de *Cyprinus carpio* y *Corydoras paleatus* luego de la inyección de una dosis subletal de BNF en condiciones estándar de laboratorio

Índices fisiológicos	<i>C. carpio</i>		<i>C. paleatus</i>	
	Control	BNF	Control	BNF
Factor de Condición	1,17 ± 0,03 (7)	1,18 ± 0,02 (8)	1,95 ± 0,09 (10)	1,92 ± 0,06 (10)
Índice hepatosomático	2,08 ± 0,17 (7)	2,04 ± 0,09 (8)	1,04 ± 0,07 (10)	1,01 ± 0,11 (10)

Los datos se expresan como media ± ESM, entre paréntesis se indica el número de muestras. BNF, peces inyectados con 50 mg/kg p.c. de β-naftoflavona; Control, peces inyectados con aceite de maíz. Las diferencias estadísticas respecto al grupo control se evaluó mediante en *test t* de Student ($p < 0,05$) para cada especie prueba.

Respecto a los parámetros bioquímicos evaluados en estos ensayos se evidenció un incremento significativo en la actividad de la GST de los peces inyectados con BNF tanto en *C. carpio* (48%) como en *C. paleatus* (52%). Respecto a la actividad de las enzimas antioxidantes, la actividad de la CAT evidenció un aumento significativo en ambas especies prueba, siendo 2 veces mayor en las carpas y un 32% en las Corydoras inyectadas con BNF respecto a los ejemplares control de cada especie. La actividad de la SOD evidenció una respuesta diferencial en ambas especies observándose un incremento del 58% en las carpas y una disminución del 39% en las Corydoras inyectadas con BNF. Así mismo se detectó daño oxidativo a nivel de lípidos en *C. carpio*, observándose un incremento de 2,2 veces en los niveles de TBARS de los ejemplares inyectados con BNF. Se detectó un incremento en la actividad del citocromo P450 1A tanto en las carpas como en las Corydoras inyectadas con BNF a nivel de la expresión de la proteína CYP1A. El análisis de *Western blot* evidenció una banda reactiva del peso molecular esperado (55 kDa) correspondiente a la CYP1A de peces en los ejemplares inyectados con BNF (Figura 4.4). No se observaron bandas reactivas en los ejemplares control inyectados con aceite de maíz. Al mismo tiempo, en las carpas se evidenció un incremento en la actividad catalítica de la CYP1A. En la Figura 4.3 se puede

observar un aumento significativo de 11 veces en la actividad de la EROD en las carpas inyectadas con BNF respecto de los ejemplares control (Figura 4.3).

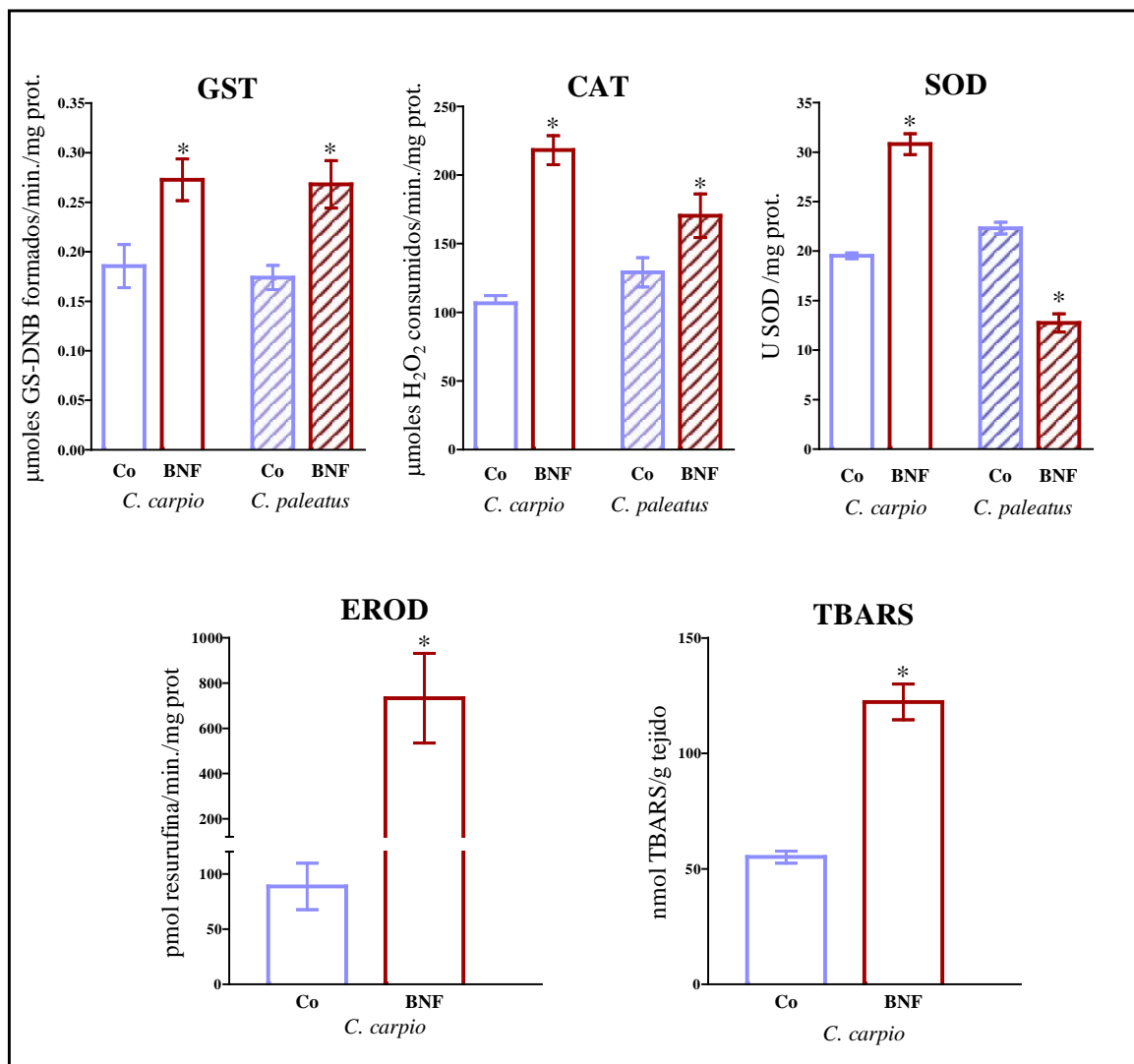


Figura 4.3. Parámetros bioquímicos de *C. carpio* y *C. paleatus* luego de la inyección de una dosis subletal de β -naftoflavona. **BNF**, peces inyectados con 50 mg/kg p.c. de β -naftoflavona (*C. carpio* $n=8$ y *C. paleatus* $n=10$); **Co**, peces inyectados con aceite de maíz (*C. carpio* $n=7$ y *C. paleatus* $n=10$). Los datos se expresan como media \pm ESM. Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron mediante *test t* de Student ($p < 0,05$) para cada especie prueba. (*) Indica diferencias significativas respecto al control de cada especie.

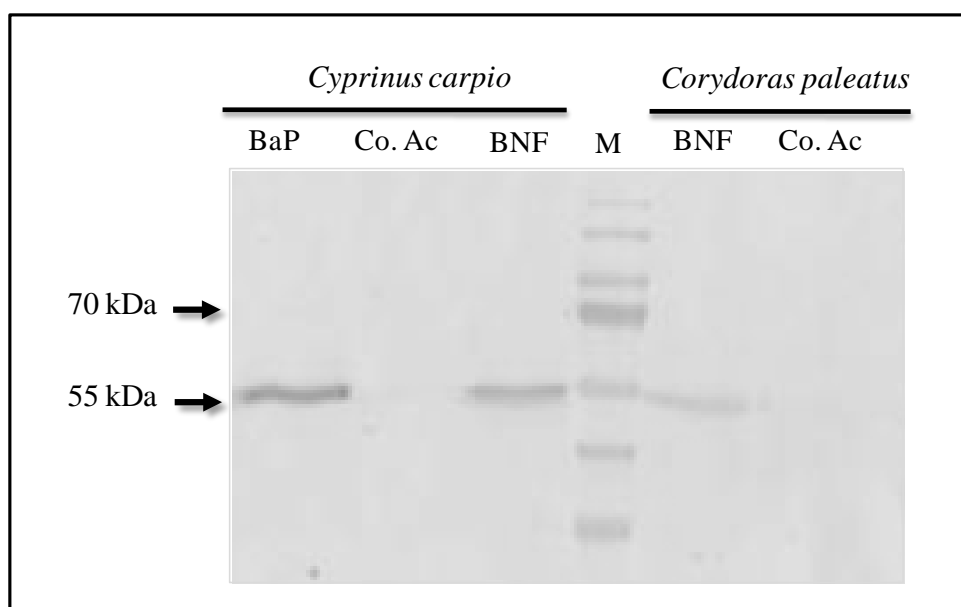


Figura 4.4. Inmunodetección por *Western blot* de la expresión de la proteína CYP1A de *C. carpio* y la especie nativa *C. paleatus* luego de 48h de exposición a HAPs por medio de una única inyección intraperitoneal. Muestras de la fracción FS de peces inyectados con 50 mg β -naftoflavona/kg p.c. (BNF), 20 mg benzo(a)pireno/kg p.c. (BaP), aceite de maíz como control negativo (Co. Ac); M, marcador de peso molecular (*Page Ruler*TM, *Prestained Protein Ladder*, Fermentas).

Con benzo(a)pireno

No se observaron cambios significativos en los índices fisiológicos de *C. carpio* luego de la aplicación de una única inyección intraperitoneal de 10 mg/kg p.c. de BaP (Tabla 4.2). La evaluación de los parámetros bioquímicos analizados en este caso no evidenció cambios significativos a nivel de actividad enzimática de GST. Sin embargo, se observó un incremento significativo en el contenido de metabolitos biliares de los peces inyectados con BaP (16 veces más) respecto a los controles (Figura 4.5). Respecto a la actividad de las enzimas antioxidantes no se observó cambios a nivel de CAT, pero se evidenció un aumento del 67% en la actividad de SOD de las carpas inyectadas con BaP. Al mismo tiempo, se evidenció daño oxidativo a nivel de lípidos detectándose un incremento del 39% en los niveles de TBARS de los peces inyectados con BaP. Por su parte, el análisis de *Western blot* mostró una respuesta inmune para el citocromo P450 1A, observándose una banda reactiva del tamaño esperado (55-60 kDa) en los peces inyectados con BaP (Figura 4.7).

Tabla 4.2. Índices fisiológicos de *Cyprinus carpio* luego de la inyección de una dosis subletal de BaP en condiciones estándar de laboratorio

Índices fisiológicos	Control	BaP
Factor de Condición	1,29 ± 0,03 (5)	1,30 ± 0,05 (5)
Índice hepatosomático	2,23 ± 0,17 (5)	2,79 ± 0,38 (5)

Los datos se expresan como media ± ESM, entre paréntesis se indica el número de muestras. BaP, peces inyectados con 10 mg/kg p.c. de benzo(a)pireno; Control, peces inyectados con aceite de maíz. Las diferencias estadísticas respecto al grupo control se evaluó mediante en *test t* de Student ($p < 0,05$).

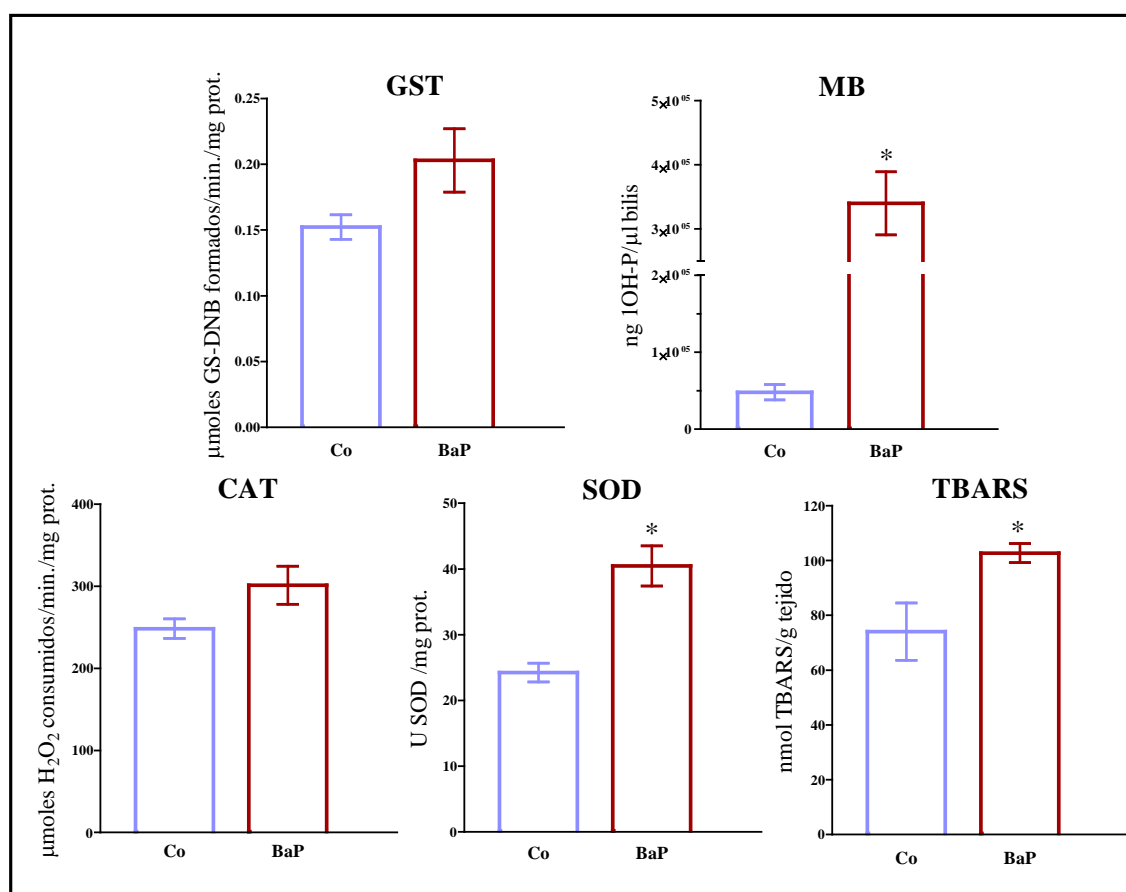


Figura 4.5. Parámetros bioquímicos de *Cyprinus carpio* luego de la inyección de una dosis subletal de benzo(a)pireno. **BaP**, peces inyectados con 10 mg/kg p.c. de benzo(a)pireno; **Co**, peces inyectados con aceite de maíz. Los datos se expresan como media ± ESM; $n=5$ para cada grupo. Las diferencias estadísticas significativas entre los grupos se evaluaron mediante *test t* de Student ($p < 0,05$). (*) Indica diferencias significativas respecto al control.

4.3.2 Exposición en agua

Cyprinus carpio

Luego de 14 días de exposición a dos concentraciones subletales de BaP en agua no se observaron cambios significativos en el FC, sin embargo el IHS de los peces expuestos a 10 µg/L de BaP incrementó significativamente respecto al de los individuos control (59%) (Tabla 4.3). Respecto a los biomarcadores bioquímicos asociados al estrés oxidativo, se observó un incremento significativo en la actividad enzimática de SOD en los peces expuestos a 10 µg/L de BaP respecto los controles y a los expuestos a 1 µg/L (37% y 67% respectivamente). Sin embargo no se detectaron cambios significativos en la actividad de la CAT ni en los niveles de TBARS (Figura 4.6). Acerca de los biomarcadores asociados a la biotransformación no se observaron cambios en la actividad de la GST (Figura 4.6) sin embargo se evidenciaron cambios a nivel de la expresión de la proteína CYP1A. Como se observa en la Figura 4.7 se detectó una débil banda reactiva específica del tamaño esperado (55 - 60 kDa) en los individuos expuestos a BaP (10 µg/L). A su vez, se evidenció un importante incremento en los niveles de metabolitos biliares del BaP en las carpas expuestas a 10 µg/L de 42 veces más respecto al control y 4 veces mayores a los niveles medidos en los individuos expuestos a 1 µg/L (Figura 4.6).

Pimelodella laticeps

Luego de 14 días de exposición de *P. laticeps* a dos concentraciones subletales de BaP en agua no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros fisiológicos evaluados (Tabla 4.4). Respecto a los parámetros bioquímicos no se detectaron diferencias significativas en la actividad de GST de los peces expuestos a ninguna de las dos concentraciones de BaP (Figura 4.9). Sin embargo, se detectó un incremento en los niveles de metabolitos biliares del BaP tanto en los peces expuestos a 1 µg/L como a 10 µg/L respecto a los controles (43 y 117 veces respectivamente) (Figura 4.9). Los parámetros asociados al estrés oxidativo evidenciaron un incremento significativo tanto a nivel de la actividad enzimática de la SOD y CAT, así como en los niveles de TBARS. En los peces expuestos a BaP 1 µg/L se evidenció un incremento del 74% en la actividad de la CAT respecto a los controles. Al mismo tiempo, en los peces expuestos a BaP 10 µg/L se observó un incremento

en la actividad de ambas enzimas respecto a los controles (84 % SOD y 71 % CAT) y respecto a los expuestos a 1 µg/L la SOD incrementó su actividad en un 50 %. La exposición de los bagrecitos a esta última concentración de BaP también propició un incremento del 60% en los niveles de TBARS respecto a los peces expuestos a 1 µg/L y a los controles (Figura 4.9).

Un período de exposición de 7 días a las dos concentraciones de BaP en agua tampoco produjo variaciones en los parámetros fisiológicos de *P. laticeps* (Tabla 4.4). Respecto a los parámetros asociados al estrés oxidativo determinados en este período, la exposición a BaP no modificó la actividad de la CAT y al mismo tiempo no promovió una respuesta uniforme en los niveles de TBARS, aunque hubo un incremento en los peces expuestos a 1 µg/L respecto a los controles (53%). Sin embargo, se evidenció un importante efecto a nivel de biotransformación, detectándose un incremento significativo en la actividad de GST de los peces expuestos a BaP 10 µg/L respecto a controles (70% Co). Así mismo, se observó un incremento en los niveles de metabolitos biliares del BaP tanto en los peces expuestos a 1µg/L como a 10 µg/L respecto al control (16 y 197 veces respectivamente) (Figura 4.9). Respecto a los parámetros moleculares evaluados, se detectó por medio del análisis por *Western blot* una banda del tamaño esperado (55 kDa) correspondiente a la CYP1A sólo en los peces expuestos BaP 10 µg/L y en los inyectados con BNF (50 mg/kg p.c.) utilizado como control positivo (Figura 4.8).

Cabe mencionar que tanto para *C. carpio* como para *P. laticeps* no se observaron diferencias significativas entre los peces que permanecieron en agua de red (Co) y los expuestos a la máxima concentración del solvente utilizado como vehículo del BaP (Co. Sv) en ninguno de los biomarcadores evaluados.

Tabla 4.3. Índices fisiológicos de *Cyprinus carpio* luego de 14 días de exposición a dos concentraciones subletales de BaP disuelto en agua bajo condiciones estándar de laboratorio.

Índices fisiológicos	Co	Co. Sv.	BaP 1	BaP 10
Factor de Condición	1,22 ± 0,034 (7)	1,35 ± 0,05 (8)	1,34 ± 0,04 (8)	1,31 ± 0,03 (8)
Índice hepatosomático	1,25 ± 0,06 (7)	1,82 ± 0,02 (8)	1,72 ± 0,12 (8)	1,99 ± 0,14* (8)

Los datos se expresan como media ± ESM, entre paréntesis se indica el número de muestras. Co, peces en acuario control expuestos a agua de red no clorada; Co. Sv, peces en acuario control solvente expuestos a una solución de acetona 0,05 % v/v; BaP 1 y 10, peces expuestos a 1 y 10 µg BaP/L. Las diferencias estadísticas significativas entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA ($p < 0,05$) y comparaciones múltiples Prueba de Tukey. (*) Indica diferencias significativas respecto a individuos control (Co).

Tabla 4.4. Índices fisiológicos de *Pimelodella laticeps* luego 7 y 14 días de exposición a dos concentraciones subletales de BaP disuelto en agua bajo condiciones estándar de laboratorio.

	7 días				14 días			
	Co	Co. Sv	BaP 1	BaP 10	Co	Co. Sv	BaP 1	BaP 10
FC	0,71±0,02 (10)	0,72±0,01 (10)	0,73±0,03 (10)	0,71±0,01 (10)	0,75±0,02 (10)	0,78±0,02 (10)	0,79±0,01 (10)	0,78±0,02 (10)
IHS	1,17±0,05 (10)	1,13±0,06 (10)	1,18±0,05 (10)	1,19±0,07 (10)	1,13±0,08 (10)	1,23±0,06 (10)	1,45±0,06 (10)	1,35±0,09 (10)

Los datos se expresan como media ± ESM, entre paréntesis se indica el número de muestras. Co, peces en acuario control expuestos a agua de red no clorada; Co. Sv, peces en acuario control solvente expuestos a una solución de acetona 0,05 % v/v; BaP 1 y 10, peces expuestos a 1 y 10 µg BaP/L. Las diferencias estadísticas significativas entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA ($p < 0,05$) y comparaciones múltiples Prueba de Tukey. FC: factor de condición; IHS: índice hepatosomático.

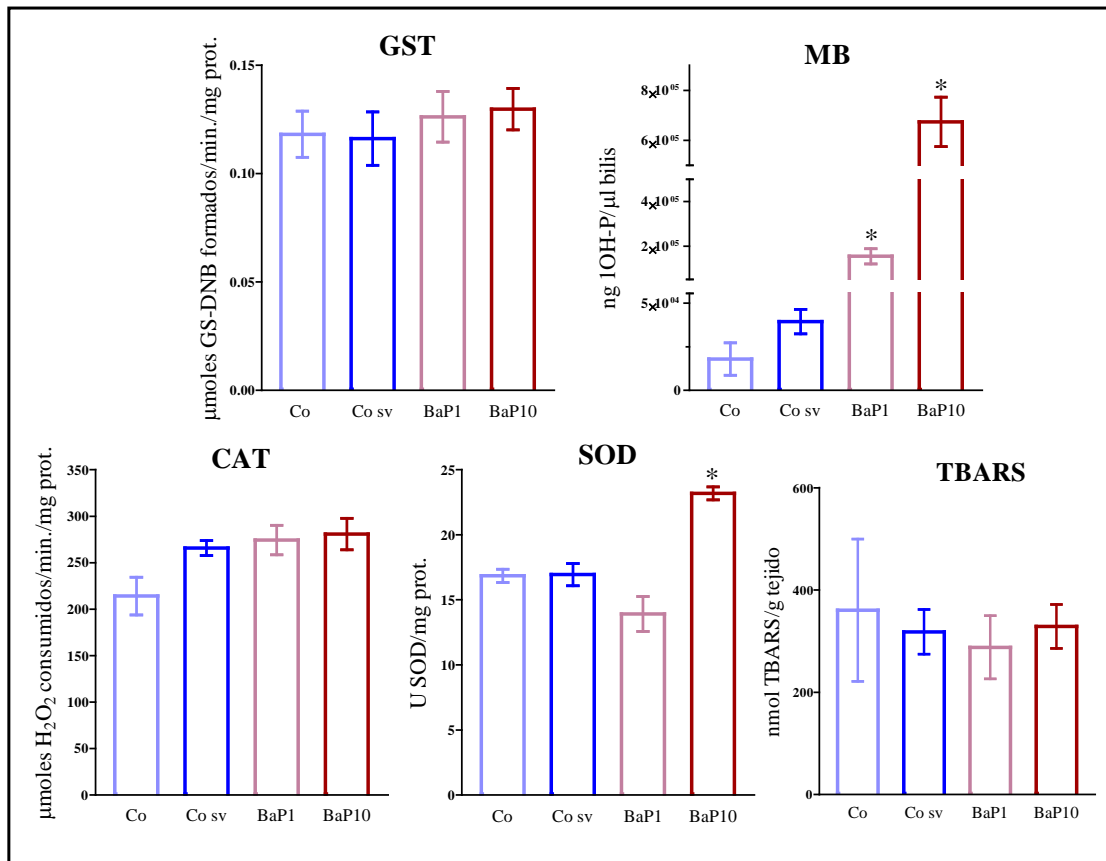


Figura 4.6. Biomarcadores bioquímicos de *C. carpio* evaluados luego de la exposición a dos concentraciones de benzo(a)pireno (**BaP**) en agua bajo condiciones estándar de laboratorio. **Co**, peces en acuario control expuestos a agua de red no clorada ($n=7$); **Co. Sv**, peces en acuario control solvente expuestos a una solución de acetona 0,05 % v/v ($n=8$); **BaP 1** y **10**, peces expuestos a 1 y 10 $\mu\text{g BaP/L}$ ($n=8$ para cada grupo). Los datos se expresan como media \pm ESM. Las diferencias estadísticas entre grupos fueron analizadas mediante ANOVA ($p<0,05$) y comparaciones múltiples, prueba de Tukey; (*) indica diferencias significativas respecto al resto de los grupos evaluados.

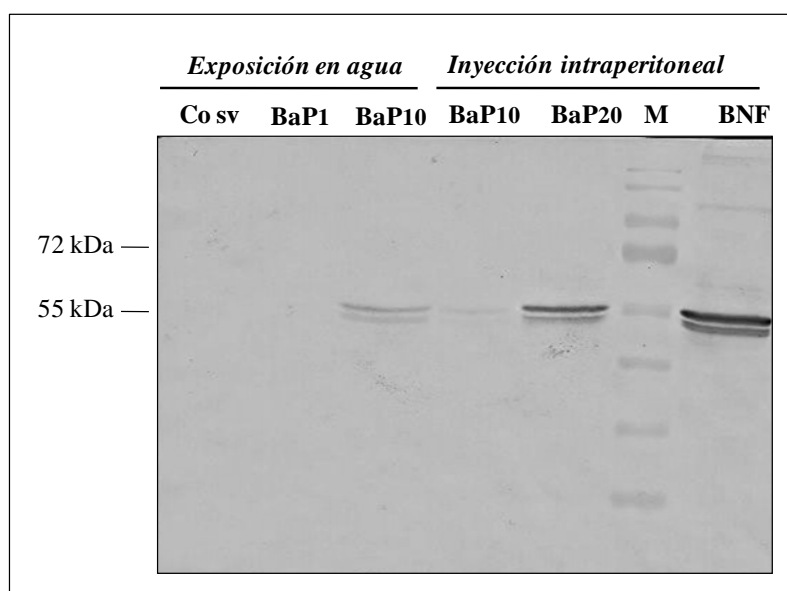


Figura 4.7. Inmunodetección por *Western blot* de la proteína CYP1A de *C. carpio* luego de la exposición a BaP en agua y por medio de inyección intraperitoneal. Muestras de la FS: **Co sv**, control solvente; **BNF**, control positivo de β -naftoflavona (50 mg/kg); **BaP**, expuestos a una concentración de benzo(a)pireno en $\mu\text{g/L}$ en ensayo de exposición en agua y mg/kg en ensayo de inyección intraperitoneal; **M**, marcador de peso molecular (*Page RulerTM. Prestained Protein Ladder*, Fermentas).

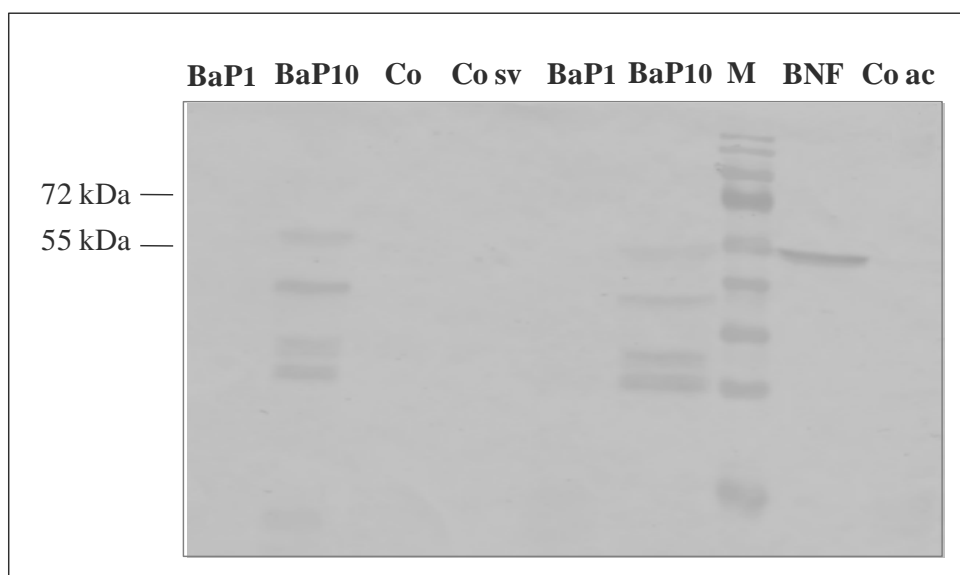


Figura 4.8. Inmunodetección por *Western blot* de la proteína CYP1A de *P. laticeps* luego de la exposición a dos concentraciones de BaP en agua. Se sembraron muestras de la fracción FS de peces en las siguientes condiciones: **BNF y Co ac**, inyectados con β -naftoflavona 50mg/kg p.c. (Control Positivo) y con aceite de maíz (Control Negativo); **Co y Co sv**, expuestos en agua de red no clorada (Control) y con acetona (Control solvente); **BaP 1 y 10**, expuestos a 1 y 10 $\mu\text{g/L}$ de BaP disuelto en acetona en agua de red no clorada; **M**, marcador de peso molecular (*Page RulerTM. Prestained Protein Ladder*, Fermentas).

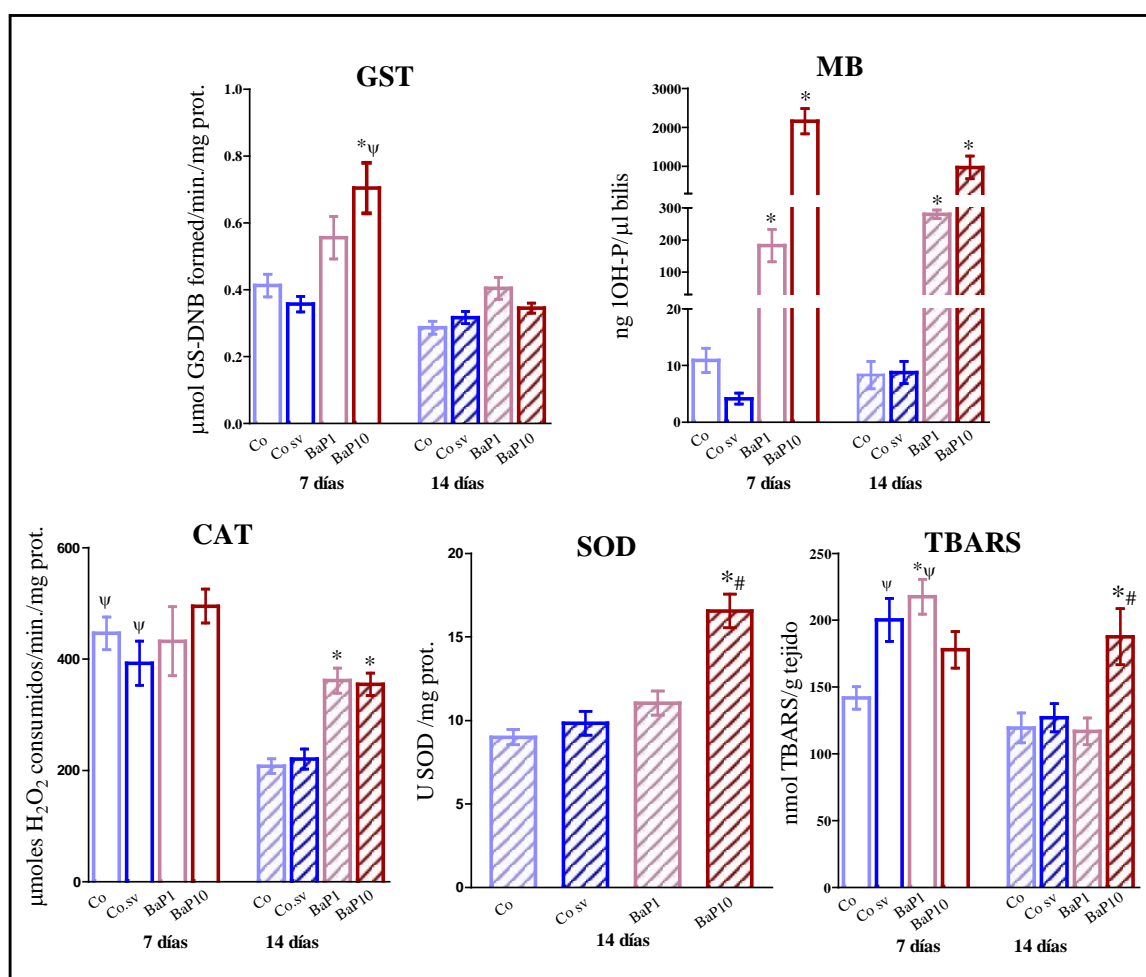


Figura 4.9. Biomarcadores bioquímicos de *P. laticeps* evaluados luego de 7 y 14 días de exposición a dos concentraciones de benzo(a)pireno (**BaP**) en agua bajo condiciones estándar de laboratorio. **Co**, peces en acuario control expuestos a agua de red no clorada; **Co. Sv**, peces en acuario control solvente expuestos a una solución de acetona 0,05 % v/v; **BaP 1** y **10**, peces expuestos a 1 y 10 µg BaP/L. Los datos se expresan como media \pm ESM; $n=10$ para cada grupo. Las diferencias estadísticas entre grupos fueron analizadas mediante ANOVA ($p<0,05$) y comparaciones múltiples *Test* de Tukey; (*) Indica diferencias significativas respecto al control y (#) a la otra concentración para el mismo tiempo de exposición. (Ψ) Indica diferencias respecto al tiempo de exposición para el mismo tratamiento.

4.3.3 Exposición a sedimento fortificado

La exposición de 21 días a sedimento fortificado con BaP no promovió cambios en los índices fisiológicos de ninguna de las dos especies prueba (Tabla 4.5) aunque se evidenció una diferencia significativa entre los niveles de ambas especies. Respecto a los parámetros de estrés oxidativo, se observó un incremento significativo a nivel de las actividades de las enzimas antioxidantes, tanto CAT (34%) como SOD (47%) en las carpas expuestas al

sedimento fortificado con BaP respecto a las que permanecieron en el sedimento control, mientras que los niveles de TBARS por el contrario disminuyeron (-25%) respecto a controles. Por el contrario, la exposición a BaP en sedimento de la especie nativa no propició cambios significativos en estos parámetros (Figura 4.10). Sin embargo, en ambas especies prueba se evidenció una respuesta a nivel de biotransformación. Como se observa en la Figura 4.10 un incremento en la actividad de la GST y de la EROD se evidenció tanto en *C. carpio* (51% y 58% respectivamente) como en *H. littorale* (23% y 51% respectivamente) expuestos al sedimento fortificado con BaP. Por su parte, los procesos de detoxificación fueron evidenciados por el incremento en los niveles de metabolitos biliares, 37 y 16 veces mayor en las carpas y cascarudos expuestos al sedimento fortificado respecto a los peces que permanecieron en el sedimento control (Figura 4.10). Respecto a la expresión de la proteína CYP1A, en la Figura 4.11 se observa el *Western blot* de las muestras de la FS de ejemplares de ambas especies luego de la exposición a sedimento fortificado con BaP. La presencia de bandas reactivas indica la expresión de la proteína CYP1A en las muestras de ejemplares de *H. littorale* y de menor intensidad en las de *C. carpio* expuestos a sedimento fortificado con BaP. Se evidenció la presencia de bandas del tamaño esperado en las muestras de FS obtenidas de los ejemplares de ambas especies que recibieron una inyección intraperitoneal de 50 mg BNF/kg (control positivo), al mismo tiempo no se observaron bandas en las muestras correspondientes a los ejemplares que permanecieron expuestos al sedimento control.

Tabla 4.5. Índices fisiológicos de *Cyprinus carpio* y *Hoplosternum littorale* luego de 21 días de exposición a sedimento fortificado con BaP en condiciones de laboratorio.

	<i>C. carpio</i>		<i>H. littorale</i>	
Índices fisiológicos	S. Co	S. BaP	S. Co	S. BaP
Factor de Condición	1,11 ± 0,02 (10)	1,13 ± 0,02 (10)	1,47 ± 0,03 (8) #	1,47 ± 0,03 (8) #
Índice hepatosomático	1,64 ± 0,07 (10)	1,61 ± 0,06 (10)	0,73 ± 0,03 (8) #	0,73 ± 0,05 (8) #

Los datos se expresan como media ± ESM, entre paréntesis se indica el número de muestras. S. Co, peces en acuario con sedimento control proveniente del arroyo Las Flores; S. BaP, peces en acuario con sedimento fortificado con benzo(a)pireno. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA de dos vías (p<0,05). (#) Indica diferencias significativas respecto a *C. carpio*.

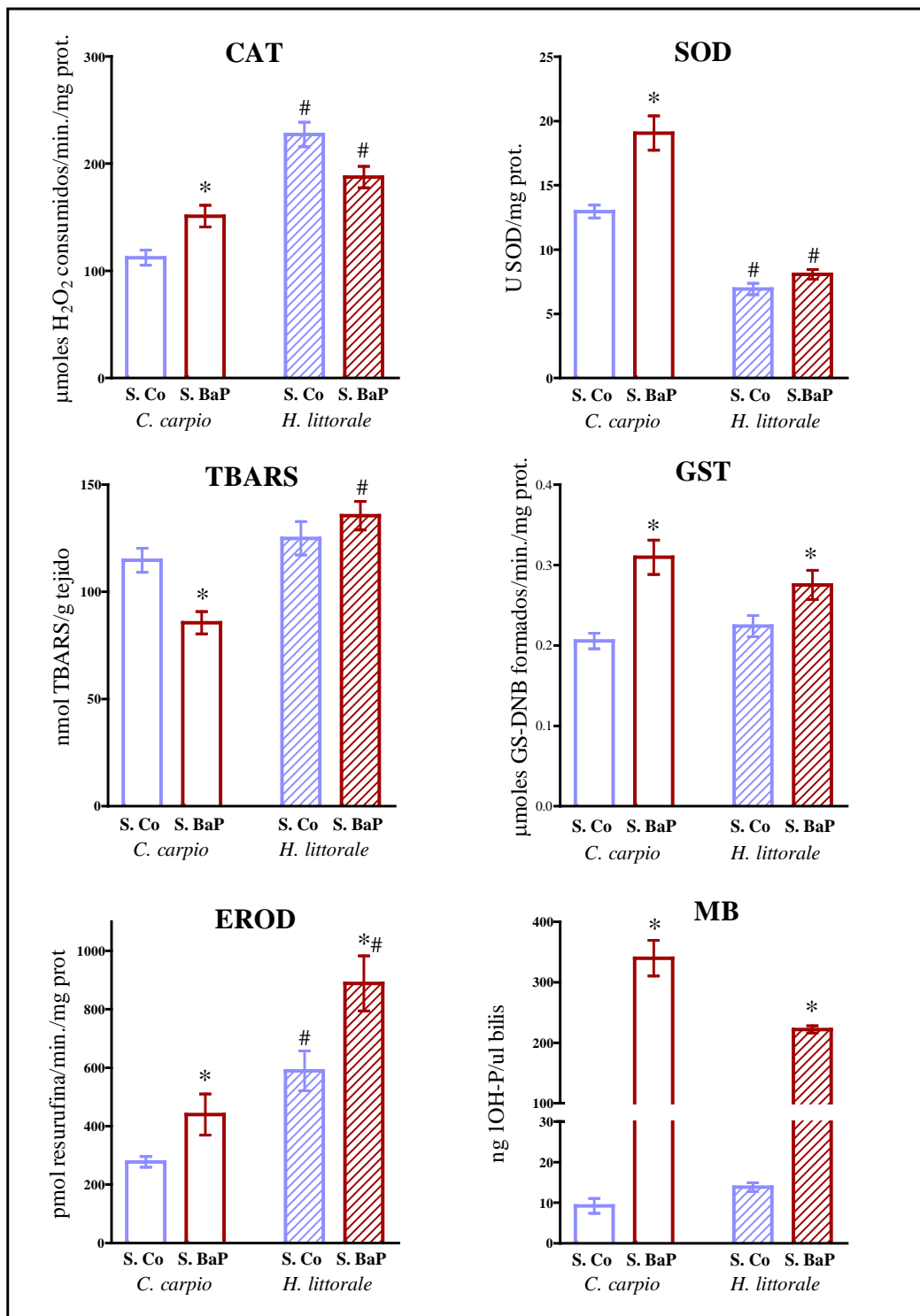


Figura 4.10. Biomarcadores bioquímicos de *C. carpio* y *H. littorale* evaluados luego de la exposición a sedimento fortificado con benzo(a)pireno bajo condiciones estándar de laboratorio. **S. Co**, peces en acuario con sedimento control proveniente del arroyo Las Flores; **S. BaP**, peces en acuario con sedimento fortificado con benzo(a)pireno. Los datos se expresan como media ± ESM; $n=10$ y $n=8$ para cada tratamiento de *C. carpio* y *H. littorale* respectivamente. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA de dos vías y comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0,05$). (*) Indica diferencias significativas respecto al control. (#) Indica diferencias significativas respecto a *C. carpio*.

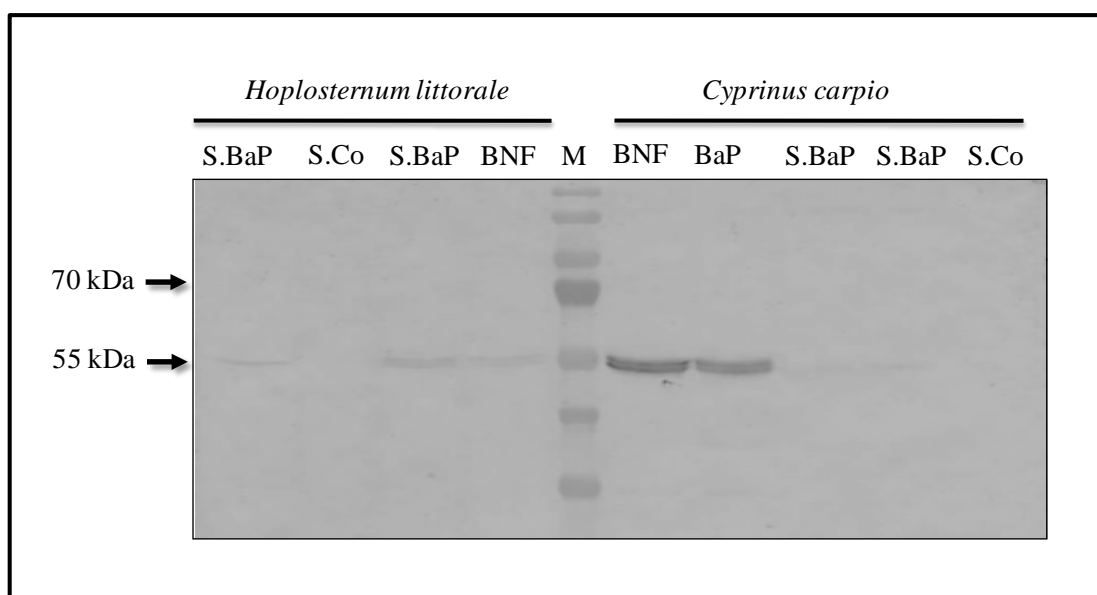


Figura 4.11. Inmunodetección por *Western blot* de la expresión de la proteína CYP1A de *C. carpio* y la especie nativa *H. littorale* luego de 21 días de exposición a sedimento fortificado con benzo(a)pireno. Muestras de la fracción FS de peces expuestos a sedimento control del A° Las Flores (**S.Co**); sedimento fortificado con benzo(a)pireno (**S.BaP**); inyectados con 50 mg β -naftoflavona/kg p.c. como control positivo (**BNF**); **M**, marcador de peso molecular (*Page RulerTM*, *Prestained Protein Ladder*, Fermentas).

4.3.4 Parámetros fisicoquímicos y determinación de HAPs en sedimento

En la Tabla 4.6 se incluyen los valores de los parámetros fisicoquímicos evaluados a lo largo de todo el estudio registrados por medio de electrodos y determinados en el laboratorio. Los valores registrados que se presentan en esta tabla corresponden a los primeros ensayos realizados en agua durante el período de aclimatación. Considerando que durante el ensayo los peces no reciben alimento y que los ensayos son de flujo continuo o de renovación diaria, los valores de los nutrientes debieran mantenerse entre los valores registrados o menores. Los valores registrados se encuentran por debajo de las cantidades máximas permitidas (MPQ) tanto de acuerdo con la Ley 24051 para la protección de la vida de agua dulce como con Berón (1984). En base a los resultados obtenidos y dada la estabilidad de los valores registrados en los parámetros del agua, el seguimiento de estos parámetros fue realizado solamente en los ensayos con sedimento.

Tabla 4.6. Parámetros fisicoquímicos determinados en diferentes ensayos en agua.

Parámetros	N	V.R	MPQ
Temperatura (°C)	27	21,7 ± 0,5	
pH	27	8,25 ± 0,03	7,5-8,5 ^b
OD (mgO ₂ /L)	27	7,6 ± 0,2	> 4 ^b
Conductividad (µS/cm)	27	939,9 ± 1,3	
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	9	0,32 ± 0,09	1,13 ^a
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	10	0,04 ± 0,01	0,06 ^a
PRS (mg/L)	10	0,08 ± 0,01	

V.R., valores registrados de cada parámetro en diferentes ensayos en agua durante períodos de aclimatación, se expresan como media ± ESM; **N**, número de muestras evaluadas. **MPQ**, máximas cantidades permitidas de acuerdo con la ^(a) Ley 24051 para la protección de la vida de agua dulce y ^(b) Berón (1984).

Por su parte, la caracterización del sedimento del A° Las Flores permitió determinar que todos los valores de HAPs permanecieron por debajo de los niveles guía confirmando que es apto como sitio de referencia y sedimento control (Tabla 4.7). En particular apropiado para fortificar con BaP ya que los valores de este HAPs se encuentran muy por debajo del nivel guía. En la Figura 4.12 se indica el análisis granulométrico del sedimento del A° Las Flores procesado y utilizado en todos los ensayos tipo *spiked*, donde se puede observar un mayor porcentaje de partículas finas (limo y arcilla).

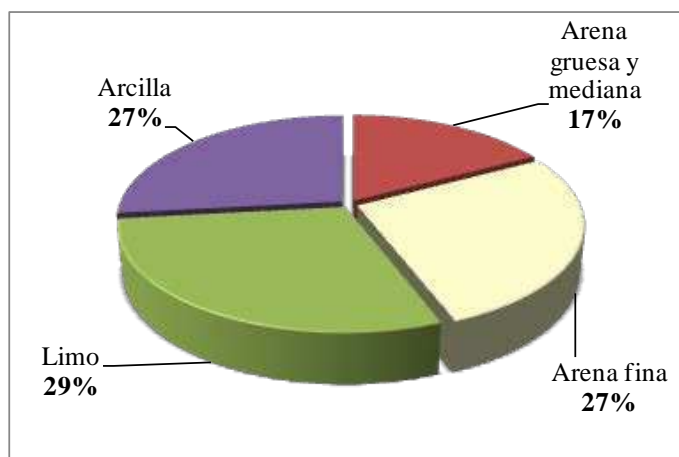
**Figura 4.12.** Composición granulométrica del sedimento de referencia utilizado en los ensayos tipo *spiked*.

Tabla 4.7. Caracterización de HAPs del sedimento del A° Las Flores utilizado en los ensayos tipo *spiked*.





#	HAPs	V. R (ng/g p.s)	NGCS (ng/g p.s)
2 -Anillos	Naftaleno	0,26	34,6
	2-metil naftaleno	0,15	20,2
	1-metil naftaleno	0,25	--
	2,6-dimetil naftaleno	1,89	--
	Bifenil	0,68	--
3 -Anillos	Acenaftileno	0,10	5,78
	Acenafteno	0,17	6,71
	Fluoreno	0,86	21,2
	Fenantreno	4,15	41,9
	Antraceno	0,50	46,9
4 -Anillos	Fluoranteno	5,48	111
	Pireno	4,78	53
	Benzo(a)antraceno	3,23	37,7
	Criseno	7,51	57,1
5 -Anillos	Benzo(b)fluoranteno	6,0	--
	Benzo(k)fluoranteno	2,71	--
	Benzo(e)pireno	3,58	--
	Benzo(a)pireno	3,45	31,9
	Perileno	20,68	--
6 A	Dibenzo(a,h)antraceno	0,79	6,22
	Indeno(1,2,3-cd)pireno	2,47	--
	Benzo(g,h,i)perileno	18,75	--

V.R: valores registrados de cada HAPs en el sedimento del A° Las Flores (SR I) utilizado para todos los ensayos tipo *spiked*; **NGCS:** niveles guía de calidad de sedimento sugeridos por Canadá (CCME, 1999-2002).

Los parámetros fisicoquímicos del agua evaluados durante el ensayo con sedimento fortificado con BaP se presentan en la Tabla 4.8. Tanto el OD, como pH y conductividad presentan valores similares entre los acuarios con sedimento control (S.Co) y sedimento fortificado con BaP (S.BaP) así como en relación al acuario que no contuvo peces durante el período experimental, esto se observa para ambas especies prueba. Respecto a los parámetros evaluados en laboratorio tanto los niveles de NH_4^+ , NO_2^- y PRS presentan valores menores en los acuarios con S.BaP para ambas especies y en esto se acentúa en el acuario sin peces. Este patrón también se observa tanto en los niveles de MPS como en los de MOP, pudiendo ser atribuido a una menor movilidad de los peces expuestos al sedimento fortificado.





Por último, las concentraciones medias efectivas y las cantidades del BaP determinadas en los diferentes sistemas experimentales se pueden observar en la Tabla 4.9. Las concentraciones de BaP en el sedimento fortificado a lo largo del período ensayado fueron similares para ambas especies prueba, siendo un poco mayor en el acuario que no contuvo peces, así mismo los valores en el S.Co fueron sustancialmente menores respecto al fortificado. Al mismo tiempo, el BaP fue detectado adsorbido al MPS evidenciando una mayor masa del mismo en el MPS del acuario con S.BaP de *H. littorale*. Así mismo, la relación de BaP presente en el sedimento respecto al MPS fue mayor en el acuario de *C. carpio* respecto a los de *H. littorale*, indicando que en estos últimos el BaP se distribuyó mas en el MPS en relación al sedimento.

Tabla 4.8. Parámetros fisicoquímicos del agua de los acuarios de ensayos de exposición con sedimento fortificado con BaP

Parámetros	<i>C. carpio</i>		<i>H. littorale</i>		Sin peces
	S. Co 	S. BaP 	S. Co 	S. BaP 	S. BaP
OD (mg/L)	5,39±0,84	5,02±1,31	5,94±0,85	6,62±0,85	7,30±0,85
pH	8,4±0,1	8,4±0,2	8,4±0,1	8,5±0,1	8,5±0,1
Conductividad (µS/cm)	954±10	960±8	955±7	964±8	943±7
NH ₄ ⁺ (mg/L)	0,28±0,11	0,19±0,11	0,26±0,09	0,20±0,07	0,11±0,01
NO ₂ ⁻ (mg/L)	0,43±0,07	0,04±0,03	0,32±0,04	0,04±0,03	0,06±0,01
PRS (mg/L)	0,23±0,11	0,09±0,11	0,19±0,10	0,09±0,05	0,19±0,10
MPS (mg/L)	441±200	213±52	573±268	274±144	10±4
MOP (mg/L)	53±18	35±7	67±25	39±14	6±2

Los datos se expresan como media ± ESM, $n=3$. **S. Co**, acuarios con sedimento control; **S. BaP**, acuarios con sedimento fortificado con benzo(a)pireno.

Tabla 4.9. Concentraciones medias efectivas y cantidades de BaP presentes en los distintos sistemas experimentales.

BaP	<i>C. carpio</i>		<i>H. littorale</i>		Sin peces
	S. Co 	S. BaP 	S. Co 	S. BaP 	S. BaP
Sedimento (ng/g p.s.)	3,6 ± 0,3	623,1±10,7	4,4 ± 1,2	624,1±40,2	647,8±52,6
MPS (ng/g p.s.)	141±36	1348±593	188,4±31,4	1249±350	512,3±73,4
BaP en MPS (*) (µg/ sist. experim.)	3,42	15,83	6,48	20,53	0,33
Relación de BaP (sedimento/MPS)	5,3	196,9	3,7	167,2	13550,3

Los datos de concentraciones efectivas se expresan como media ± ESM, $n=3$. (*) valores calculados a partir de las concentraciones medias de BaP en MPS y los valores medios de MPS presentes en los distintos sistemas experimentales.

4.4 Discusión

La contaminación de los ecosistemas acuáticos con HAPs es un fenómeno de gran importancia debido a las propiedades mutagénicas, carcinogénicas de estos compuestos y a su capacidad de bioacumularse en los organismos acuáticos.

En el presente trabajo se evaluó por medio de una inyección intraperitoneal el efecto de una dosis subletal de un HAPs modelo, la BNF, sobre las respuestas de biomarcadores de biotransformación y de estrés oxidativo en *Cyprinus carpio* y una especie nativa *Corydoras paleatus*. Al mismo tiempo se estudió el efecto del BaP, un HAP presente en el ambiente acuático aportado tanto por fuentes naturales como antrópicas que puede ser incorporado por los organismos acuáticos a través de diferentes rutas de ingreso. En particular se evaluaron las respuestas de los biomarcadores de *C. carpio* y dos especies nativas (*P. laticeps* y *H. littorale*) luego de exposiciones a dicho compuesto por medio de diferentes vías: una única inyección intraperitoneal, disuelto en agua y en sedimento fortificado. Tanto la dosis ensayada de BNF como las de BaP en diferentes matrices fueron toleradas por los peces ya que no se observó mortalidad en ninguna de las especies prueba utilizadas.

Los índices fisiológicos en general pueden ser indicadores de efecto de los tóxicos, permitiendo realizar una primera aproximación e identificar potenciales exposiciones y efectos de los poluentes por medio de mediciones sencillas (Mayer y col., 1992). Los resultados de todos los ensayos realizados con HAPs en el presente trabajo, evidenciaron que el FC de ninguna de las especies prueba se vio modificado como consecuencia de la exposición a BNF y a BaP. Estos resultados coinciden con los reportados en ejemplares de *Morone saxatilis* (Washburn y col., 1996) y en ejemplares de *C. carpio* luego de 72h de exposición (Ascar y de la Torre, 2005) inyectados con la misma dosis de BNF. Una tendencia similar fue observada en el IHS excepto en la exposición de *C. carpio* a 10 µg/L de BaP en agua, donde se observó un incremento del 59 % en relación a los ejemplares control. El IHS generalmente provee información sobre la actividad metabólica del hígado (Bagenal y Tesch, 1978). Otros autores han reportado valores elevados del IHS como resultado de la exposición a hidrocarburos, interpretando que los mismos fueron causados por hipertrofia en el hígado (Corsi y col., 2003).

El metabolismo del BaP, como el de otros HAPs, consta de dos pasos. En primer lugar, los procesos de biotransformación de fase I que involucran la acción de oxidasas y la

formación de diol-epóxidos. Se ha reportado que la inducción del citocromo P450 1A, componente terminal de las oxidasas de función mixta, tiene lugar como consecuencia de la exposición a estos compuestos (Goksøyr y Husøy, 1998). En el presente trabajo, dicha inducción medida ya sea a través de la inmunodetección de la proteína CYP1A como por medio de la actividad catalítica de la 7-etoxiresorufin-O-deetilasa (EROD) fue confirmada en los ensayos de exposición a BaP. En *C. carpio* se observó una inducción en la expresión de la CYP1A tanto en los peces inyectados con BaP (20mg/kg), BNF (50 mg/kg) y expuestos a BaP en agua (10 µg/L). En los peces inyectados con 10 mg/kg de BaP se indujo su expresión aunque la banda reactiva correspondiente a CYP1A fue observada débilmente. Al mismo tiempo, la inducción de esta proteína fue observada en los ejemplares de *P. laticeps* expuestos durante 7 días a 10 µg/L de BaP en agua y luego de la inducción con 50 mg/kg de BNF. Cabe mencionar, que en ambas especies prueba este parámetro no fue inducido en los ejemplares expuestos a la concentración más baja de BaP en agua (1 µg/L) ni en ninguno de los grupos control. Resultados similares fueron reportados por diversos autores luego de la inducción de diferentes especies con BNF, por ejemplo: el bacalao (*Gadus morhua*) (Husøy y col., 1996), la trucha arco iris (Aluru y Vijayan, 2004) y en el lenguado (*Scophthalmus maximus L*) (Hartl y col., 2007). A su vez, Patel y col. (2006) reportaron un incremento concentración dependiente de la CYP1A luego de la exposición de *Fundulus heteroclitus* a las mismas concentraciones de BaP en agua que las utilizadas en este trabajo. Estos autores también observaron la expresión de la CYP1A en los ejemplares expuestos a 1 µg/L de BaP. Por su parte, la exposición a sedimento fortificado con BaP evidenció una inducción del citocromo P450 1A principalmente a través del incremento en la actividad de la EROD tanto de *C. carpio* como de *H. littorale* con un incremento similar de ambas especies respecto a su control (Figura 4.13 A). Bonacci y col. (2003) reportaron una relación dosis-respuesta en la actividad de la EROD de anguilas europeas expuestas tanto a BNF como a BaP dentro del rango 0,1 - 10 mg/kg de exposición intraperitoneal.

Por otra parte, durante el metabolismo de fase II se incluye la conjugación de ciertos HAPs (entre ellos el BaP) con intermediarios como el glutatión, a través de la actividad de la GST. El incremento de la actividad de la GST ha sido reportada por diversos autores en ensayos de laboratorio como consecuencia de la exposición a diversos agentes inductores tales como los HAPs (van der Oost y col., 2003) y en particular con BNF (Ascar y de la Torre, 2005; Scarcia y de la Torre, 2008). En el presente estudio la exposición de *C. carpio* a

BaP por medio de una inyección intraperitoneal de (10 mg BaP/kg) no evidenció cambios significativos en la actividad de esta enzima. Sin embargo, se observó un incremento en la actividad de la GST en los ejemplares de *C. carpio* (48%) y de *C. paleatus* (52%) inyectados con BNF. De la misma manera, Ascar (2006) reportó un incremento en la actividad de esta enzima en *C. carpio* bajo las mismas condiciones experimentales que se utilizaron en este trabajo. Al mismo tiempo, la exposición de *C. carpio* a BaP en agua (1 y 10 µg/L) tampoco evidenció cambios significativos en la actividad de la GST. Resultados similares fueron reportados por Jifa y col. (2006) para *Lateolabrax japonicus* considerando tiempos de exposición similares (12-15 días) para concentraciones de BaP en agua en el orden de las evaluadas en el presente estudio. Sin embargo estos autores observaron una disminución significativa en un tiempo menor (6 días) y luego un incremento significativo en un período mayor al de este estudio. Por su parte, al evaluar la respuesta de esta enzima en la especie nativa (*P. laticeps*) luego de 7 y 14 días de exposición a dos concentraciones de BaP en agua observamos en el tiempo inicial un incremento significativo respecto al grupo control y luego una disminución en la actividad sin diferenciarse del control. Esto fue observado únicamente para la mayor concentración de BaP en agua. Por otra parte, la exposición de 21 días a BaP por medio de sedimentos fortificados favoreció un incremento en la actividad de la GST tanto en *C. carpio* (51%) como en *H. littorale* (23%). En este estudio también se observó un incremento en la actividad de la GST en los ejemplares de *C. carpio* (48%) y de *C. paleatus* (52%) inyectados con BNF.

Finalmente, en la Figura 4.13 A se pueden observar en forma comparativa las respuestas de los parámetros biomarcadores a nivel de biotransformación en *C. carpio* y en las especies nativas luego de la exposición a BaP por medio de diferentes matrices. En todos los casos se evidenció una tendencia de incremento tanto a nivel de fase I, ya sea a por medio de la expresión de la CYP1A como de su actividad catalítica (EROD), como a nivel de fase II (GST). El incremento de esta última enzima fue más evidente frente a la exposición del BaP por medio de sedimento fortificado y en la especie *C. carpio*.

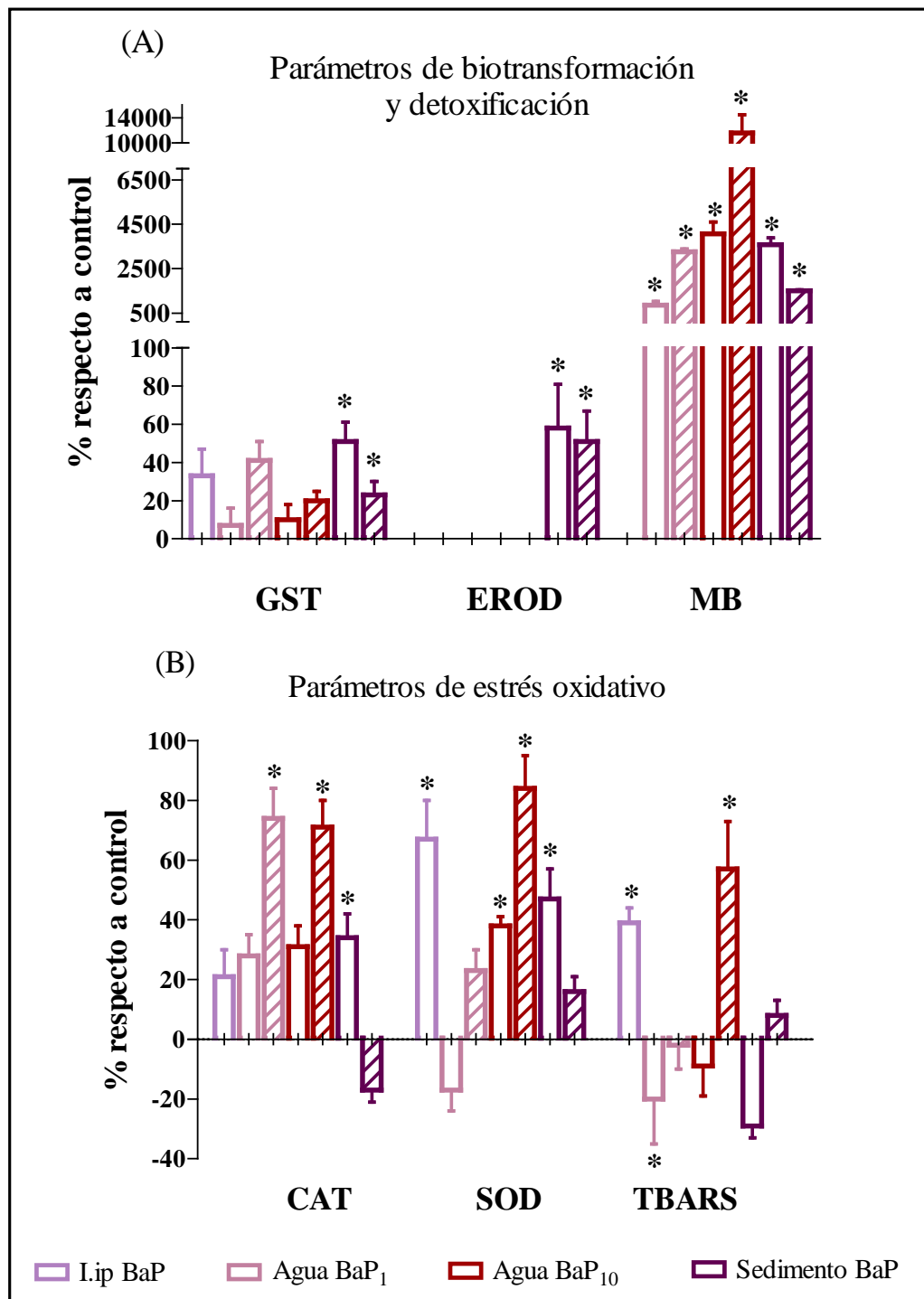


Figura 4.13. Parámetros biomarcadores (A) de biotransformación y detoxificación (B) y de estrés oxidativo evaluados en *C. carpio* (barras vacías) y las especies nativas (barras rayadas) luego de la exposición a BaP en las diferentes matrices. **I.ip**, peces expuestos a BaP por medio de una inyección intraperitoneal; **Agua BaP₁**, peces expuestos a BaP en agua (1 $\mu\text{g/L}$); **Agua BaP₁₀**, peces expuestos a BaP en agua (10 $\mu\text{g/L}$); **Sedimento BaP**, peces expuestos a sedimento fortificado con BaP. Las barras representan el porcentaje de incremento o disminución de la respuesta de cada parámetro respecto a su control respectivo. (*) Indica aquellos parámetros que se diferenciaron significativamente de su grupo control.

El metabolismo de estos poluentes puede generar especies reactivas de oxígeno (EROs) capaces de reaccionar con macromoléculas produciendo lesiones, por ejemplo a nivel de lípidos. Dentro de las defensas antioxidantes enzimáticas la actividad de la CAT y SOD pueden ser alteradas por la exposición a este tipo de poluentes (Montserrat y col., 2007). La exposición a los HAPs evaluados en este trabajo por medio de una inyección intraperitoneal provocó cambios significativos en la actividad antioxidante de las enzimas evaluadas tanto en *C. carpio* como en la especie nativa. La actividad de la CAT incrementó significativamente en ambas especies frente a la dosis ensayada de BNF, mientras que con la dosis de BaP el aumento no fue significativo. A su vez, la SOD tuvo una respuesta diferencial entre ambas especies, incrementando su actividad en las carpas luego de la exposición a ambos HAPs y disminuyendo en la especie nativa frente a la dosis de BNF. Así mismo, Ascar y de la Torre (2005) reportaron la ausencia de cambios en la actividad de CAT y un incremento en la actividad de la SOD de *C. carpio* utilizando la misma dosis de BNF y bajo las mismas condiciones experimentales que en este estudio. Por su parte en *C. carpio* se observó un incremento en los niveles de TBARS, evidenciando el daño oxidativo a nivel de lípidos como consecuencia de la exposición a ambos HAPs. Esto último podría estar evidenciando que frente a este tipo de exposición la actividad de las enzimas antioxidantes no fueron suficientes para prevenir el daño oxidativo a nivel de lípidos. Luego de 14 días de exposición a BaP en agua *C. carpio* evidenció un incremento únicamente en la actividad de la SOD en los peces expuestos a 10 µg/L, por su parte no se observaron cambios a nivel de TBARS. Resultados similares han sido reportados por Jifa y col. (2006) quienes observaron luego de la inducción con concentraciones similares de BaP en agua un incremento en la actividad de la SOD, sin cambios en CAT. Estos resultados podrían estar indicando la ausencia de daño a nivel de lípidos como resultado del incremento en la actividad antioxidante evidenciada a nivel de SOD. Al mismo tiempo, el efecto del BaP sobre *P. laticeps* en el menor tiempo de exposición no promovió cambios en la actividad de CAT y tampoco una respuesta uniforme en los niveles de TBARS, aunque hubo un incremento en los peces expuestos a 1 µg/L. Sin embargo, luego de 14 días de exposición a BaP promovió un incremento en la respuesta antioxidante de ambas enzimas (SOD y CAT) así como en los niveles de TBARS, esto se manifestó de forma más evidente en la mayor concentración de BaP. Como en el caso de otros peces expuestos a distintos HAPs y a otros poluentes orgánicos todas las enzimas antioxidantes medidas resultaron inducidas, probablemente debido a un incremento en la

cantidad de aniones superóxido originados y de H₂O₂ como consecuencia de la actividad de SOD, los cuales requirieron de la actividad de CAT para su descomposición (Vega-López y col., 2008). Sin embargo el incremento en la actividad de estas enzimas no fue suficiente como para impedir el daño producido en lípidos. Esta interpretación también puede ser aplicada a los resultados obtenidos en *C. carpio* luego de la exposición a sedimento fortificado con BaP con la diferencia que en este caso se observó una disminución en los niveles de TBARS. Esta disminución podría deberse al incremento de la actividad antioxidante enzimática (SOD y CAT) ya que la disminución en los niveles de TBARS y el incremento de las enzimas podría ser un ejemplo de recuperación del daño a lípidos en el tiempo, esto ha sido observado principalmente asociado al incremento de CAT (Vega-López y col., 2008). Estos resultados sugieren que los procesos de biotransformación generados por compuestos del tipo de los HAPs involucran también la inducción de las defensas antioxidantes. Respecto a la exposición de la especie nativa, *H. littorale*, a sedimento fortificado con BaP no se evidenció una clara respuesta antioxidante ya que no se observaron cambios en los niveles de ninguna de las dos enzimas (SOD y CAT) pero tampoco se observó daño oxidativo a nivel de lípidos. Es importante tener en cuenta que la GST cataliza la conjugación del GSH con compuestos electrofílicos aunque también puede hacerlo con los derivados del proceso de peroxidación lipídica tales como el 4-hidroxinonal. De esta forma y dado que la técnica utilizada no permite identificar las distintas tipos de respuestas, no se puede descartar una acción combinada detoxificante y antioxidante por conjugación de la GST. Generalmente una inducción simultánea en la actividad de ambas enzimas ha sido observada luego de la exposición a una variedad de poluentes orgánicos y metales, sin embargo dichas respuestas pueden ser transitorias y variar para las diferentes especies (Livingstone, 2001). Sin embargo, las actividades antioxidantes hepáticas de peces expuestos a HAPs han mostrado una amplia variedad de respuestas, observándose desde incrementos, disminución y hasta ausencia de cambios, indicando una complejidad en los mecanismos de regulación. En la Figura 4.13 B se observan las respuestas de todos los parámetros biomarcadores de estrés oxidativo evaluados en *C. carpio* y especies nativas luego de su exposición a BaP a través de diferentes matrices. El incremento en este tipo de parámetros estuvo dado principalmente en la especie nativa luego de su exposición a BaP en agua, pudiendo reflejar la sensibilidad de esta especie a este tipo de exposición. Por su parte, *C. carpio* evidenció un mayor incremento en la respuesta de ambas enzimas antioxidantes luego

de la exposición a sedimento fortificado, sin detectarse daño oxidativo a nivel de lípidos. Esto estaría indicando que los procesos de biotransformación generados por compuestos del tipo de los HAPs involucran la inducción de sistemas de defensa antioxidante, no obstante, dichas respuestas estarían condicionadas por la variabilidad entre especies y por el tipo de exposición.

Por su parte, en los peces la vesícula biliar es la ruta más importante de excreción de los HAPs. Luego de la biotransformación, los metabolitos de HAPs son excretados hacia la bilis y concentrados. En el presente trabajo, se evidenció un importante incremento en los niveles de metabolitos biliares tanto en *C. carpio* como en *P. laticeps* y *H. littorale* luego de las diferentes vías de exposición ya sea por medio de una inyección intraperitoneal, en agua 1 y 10 µg/L y en sedimento fortificado (Figura 4.13 A). Este incremento en los niveles de MB fueron más evidentes en la especie nativa *P. laticeps* luego de la exposición a la concentración mayor de BaP en agua, mientras que en *C. carpio* la exposición a sedimento fortificado también evidenció incrementos importantes en los niveles de MB. Estos resultados evidencian que la exposición a BaP induce los procesos de detoxificación a través de la vesícula biliar. Resultados similares fueron repostados por diversos autores luego de la inducción con BaP por medio de inyección intraperitoneal (van der Hurk, 2006) así como por recolección de ejemplares de sitios con sedimentos contaminados con BaP y otros HAPs (Richardson y col., 2004; Yang y Baumann, 2006).

Finalmente, los niveles de BaP a los que estuvieron expuestos los ejemplares de ambas especies prueba durante los ensayos con sedimento fortificado fueron superiores a los niveles guía de calidad de sedimentos para la protección de la biota acuática sugerido por la Agencia de Protección Ambiental de Canadá (31,9 ng/g; CCME, 1999-2002). Así mismo, las concentraciones medias efectivas de BaP en el sedimento de todos los acuarios (S. BaP) se encuentran en el orden del nivel de efecto más probable sugerido por Canadá (782 ng/g; CCME, 1999-2002) y en el rango de niveles reportados por diferentes autores en ambientes contaminados (Sojinu y col., 2010; Cachot y col., 2006; 2007). Si bien las concentraciones de BaP en el sedimento fortificado a lo largo del período ensayado fueron similares para ambas especies prueba se evidenció una mayor masa de BaP en el MPS en el acuario de *H. littorale* que al mismo tiempo se relaciona con una menor relación sedimento/MPS del tóxico (ver Tabla 4.9). Por lo tanto estos resultados podrían evidenciar una distribución del BaP en ambas

matrices diferente para cada especie prueba, que a su vez puede estar relacionado con una mayor movilidad de la especie nativa lo cual también se ve reflejado en la mayor concentración de MPS detectado en el mismo acuario.

Cabe destacar que se evidenció una mayor respuesta de los biomarcadores en *C. carpio* respecto de la especie nativa tanto a nivel de biotransformación y detoxificación como los relacionados con el estrés oxidativo (Figura 4.13). Una posible interpretación de estos resultados podría estar relacionada con la incorporación del BaP vía ingesta desde el sedimento, matriz en donde el tóxico tuvo mayor presencia. A su vez, se podría relacionar con el hábito detritívoro predominante en *C. carpio* respecto a *H. littorale* que si bien se alimentan removiendo el fondo, la dieta de esta especie se basa en diferentes micro crustáceos, insectos que habitan en fondos limosos (ver capítulo 3, sección 3.1).

CAPÍTULO 5

**Efecto de compuestos desorganizadores endócrinos sobre
las respuestas de los biomarcadores**

5.1 Introducción

En los últimos años se ha evidenciado que numerosos compuestos químicos de origen antropogénico liberados al ambiente acuático son capaces de alterar el normal funcionamiento del sistema endocrino de los organismos que lo habitan y por ello se los ha denominado desorganizadores endocrinos (EDCs, del inglés *endocrine disrupting chemicals*). Entre los EDCs artificiales se encuentran insecticidas (diclorodifeniltricloroetano -DDT y metabolitos, aldrín, paratión), herbicidas (atrazina, triflouralin), biocidas (tributilestaño-TBT), estrógenos artificiales como el dietilestilbestrol, sustancias de uso cotidiano en el hogar o en la industria (alquilfenoles, PCBs, bisfenol-A). Existen diversos mecanismos por los cuales estos compuestos pueden perturbar la función endócrina. Así los mismos pueden modificar, bloquear o imitar el efecto de las hormonas sexuales esteroideas (estrógenos y andrógenos) por medio de la unión al receptor de la hormona natural, pueden alterar la síntesis y degradación de las hormonas naturales o modificar la producción y funcionamiento de los receptores de las mismas (Vazquez-Duhaldt y col., 2005).

Los alquilfenoles polietoxilados (APEs) son un grupo de tensioactivos ampliamente utilizados, una molécula de APEs consta de dos partes: alquilfenol (AP) y un resto de etoxilato (EO), esta estructura lo hace soluble en agua y ayuda a dispersar grasas y suciedad de superficies en agua. Los APEs pueden ser utilizados como detergentes, agentes humectantes, dispersantes, emulsionantes, solubilizantes y formadores de espuma. Son importantes para una serie de aplicaciones en la industria del papel, textil, plásticos, aceites lubricantes, como surfactantes en pesticidas agrícolas y combustibles, así como para el uso doméstico en la fabricación de productos de limpieza principalmente (Ying y col., 2002). Las formulaciones industriales están compuestas generalmente por mezclas en las que los principales APEs usados son octilfenol y nonilfenol polietoxilados, con una longitud de la cadena del polietoxilato que puede variar entre 1 y 50 unidades, dependiendo de su aplicación. Los APEs pueden ser biodegradados por medio de mecanismos que implican la pérdida gradual de grupos etoxi hacia congéneres más cortos, estos procesos pueden realizarse bajo condiciones aeróbicas como anaeróbicas siendo las primeras más efectivas (Ying y col., 2002). Por su parte, la temperatura también tiene una fuerte influencia en la velocidad de biodegradación de etoxilatos de nonilfenol, se ha demostrado que la biotransformación de estos compuestos es de 2-10 veces superior a mayor temperatura (Soares y col., 2008). Entre

los principales productos de la degradación microbiana se encuentran el octilfenol y el nonilfenol, los cuales son conocidos por ser más tóxicos y persistentes que sus precursores (Ying y col., 2002; Toyama y col., 2011).

El nonilfenol (NP) es un compuesto xenobiótico cuya estructura química presenta un anillo fenólico y una cadena de nueve carbonos en la posición *para* (Figura 5.1 A). En condiciones ambientales se presenta como un líquido viscoso, no miscible en agua y se produce industrialmente por alquilación bajo condiciones de catálisis ácida (Soares y col., 2008). Es un compuesto lipofílico con un elevado coeficiente de partición octanol/agua ($\log K_{ow}=4,48$) y baja solubilidad en agua (4,9 mg/L), presenta baja movilidad limitando su capacidad de difusión en la fase acuosa del suelo y sedimento y tiende a adsorberse a la materia orgánica. La presión de vapor y la constante de la Ley de Henry ($2,07 \cdot 10^{-2}$ Pa y $0,84 \text{ Pa m}^3/\text{mol}$ respectivamente) indican que se trata de un compuesto orgánico semivolátil (Vazquez-Duhaldt y col., 2005; Soares y col., 2008). En aguas superficiales la concentración del NP puede disminuir debido a la fotólisis inducida por la acción de la luz solar, sin embargo en sedimento presenta un tiempo de vida media mayor de 60 años (Shang y col., 1999). El NP ha sido identificado como uno de los metabolitos más críticos de los APEs debido a su resistencia a la biodegradación y posibilidad de acumularse en los sedimentos y bioacumularse en organismos acuáticos. Por su parte, diversos autores han reportado la actividad xenoestrogénica del NP (Solé y col., 2000; Ying y col., 2002; Lalah y col., 2003; Vazquez-Duhaldt y col., 2005; Soares y col., 2008) y se ha determinado que imita el comportamiento de la hormona endógena 17β -estradiol (E2) y compite con la misma por el sitio de unión del complejo de receptor de estrógeno (Figura 5.1B). La actividad endócrina del NP se debe principalmente a la posición *para* del grupo-OH fenólico y a la cadena lateral alifática ramificada, características que acentúan la similitud estructural entre ambos compuestos (Figura 5.1A) (Soares y col., 2008). Un aspecto a destacar es que los isómeros con cadena lateral ramificada presentan mayor resistencia a la degradación que aquellos que poseen una cadena lineal (Toyama y col., 2011).

Debido al uso intensivo de los APEs en el ámbito doméstico, en la industria del papel y textil, gran parte del NPE producido por la industria se degrada a través de tratamiento de aguas residuales industriales y municipales y se libera al medio acuático en forma de NP (95%) y otros metabolitos intermedios más persistentes. Por lo tanto, la principal fuente de

NP en las aguas superficiales (arroyos, ríos, lagos y estuarios) y en los sedimentos parece estar estrechamente relacionada con la descarga de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, con la proximidad a zonas industriales, urbanas y otras actividades antropogénicas tales como descargas de aguas pluviales y escorrentía (Hale y col., 2000; Ying y col., 2002; Lalah y col., 2003; Soares y col., 2008).

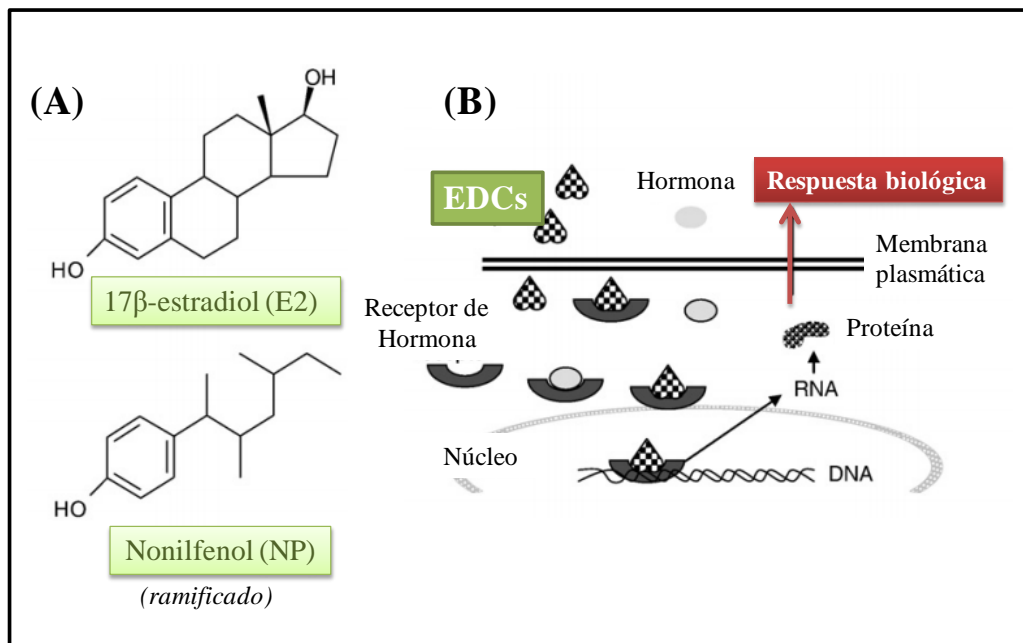


Figura 5.1. Estructura química del 17 β -estradiol y nonilfenol ramificado (A) y esquema de uno de los mecanismos de acción del nonilfenol, la competencia por la unión al receptor de estrógeno con 17 β -estradiol (B) (adaptado de Soares y col., 2008)

La distribución del NP en el medio acuático ha sido reportada en varios ríos en Europa y EE.UU., donde se ha observado que se concentra principalmente en los sedimentos (Lalah y col., 2003). Se han reportado concentraciones de NP desde 0,0232 $\mu\text{g/L}$ en áreas cercanas a zonas urbanizadas (Li y col, 2004), 15 $\mu\text{g/L}$ aguas abajo de la descarga de una planta de tratamiento de aguas residuales (Petrovic y col., 2002) y hasta 343 $\mu\text{g/L}$ muestras del efluente de plantas de tratamiento (Ying y col., 2002). Las concentraciones de NP en sedimentos de diferentes ríos cercanos a zonas urbanizadas (0,0254-0,932 $\mu\text{g/g}$) y en zonas influenciadas por descargas de plantas de tratamiento de agua los niveles van desde 0,645 $\mu\text{g/g}$ (Petrovic y col.,

2002) a 13 $\mu\text{g/g}$ (Ying y col., 2002). Por su parte, en nuestro país, se han detectado niveles de hasta 5 $\mu\text{g/g}$ y 20 $\mu\text{g/L}$ de NP en los sedimentos y aguas superficiales de arroyos del conurbano de la provincia de Buenos Aires, respectivamente (Meijide, 2007).

Diversos estudios en teleósteos han demostrado que la exposición a alquilfenoles produce trastornos a nivel reproductivo en los peces, los cuales conducen a un menor éxito reproductivo, pudiendo afectar el crecimiento poblacional y la biodiversidad de los cuerpos de agua. En particular, un efecto conocido de compuestos xenoestrógenos sobre peces ovíparos machos o juveniles es la inducción de la vitelogenina (Vtg), proteína precursora de la yema de huevo, que se produce en el hígado en respuesta a los niveles elevados de 17 β -estradiol (E2) y está presente en altos niveles en la sangre de los peces hembra. A pesar de que el gen Vtg está presente en los machos no se expresa por lo tanto los niveles plasmáticos de Vtg son normalmente bajos o inexistentes, por lo tanto la detección de los niveles de Vtg plasmáticos ha sido ampliamente utilizado como biomarcador de exposición a xenoestrógenos tanto en estudios de laboratorio como de campo (Schwaiger y col., 2002; Hennies y col., 2003; Vazquez-Duhaldt y col., 2005; Mitchelmore y Rice, 2006; Porte y col., 2006; Genovese y col., 2011).

Si bien el NP es conocido por su efecto como desorganizador endócrino, se dispone de menor información respecto a los posibles efectos adversos originados por subproductos de procesos de biotransformación que den origen a especies reactivas de oxígeno (EROs). En este contexto, el efecto sobre biomarcadores hepáticos a nivel de biotransformación fue reportado por Uguz y col. (2003) y Vaccaro y col. (2005) para el NP y el E2 mientras que Pérez Carrera y col. (2007) reportaron efectos de actividad antioxidante frente a NP. Por su parte Solé y col. (2000) han evaluado el efecto de un esteroide sintético (17 α -etinilestradiol) sobre las respuestas de enzimas de fase II y antioxidantes.

5.1.1 Hipótesis y Objetivos

Hipótesis:

La exposición de ejemplares juveniles de las especies prueba a compuestos desorganizadores endócrinos estrogenizantes produce principalmente una respuesta a nivel de la inducción de la expresión de la vitelogenina y también promueve procesos de biotransformación pudiéndose originar especies reactivas de oxígeno.

Objetivos:

1. Estudiar el efecto de compuestos inductores específicos de la expresión de la vitelogenina (17β -estradiol y nonilfenol) sobre los biomarcadores propuestos.
2. Evaluar bajo condiciones de laboratorio el efecto adverso producido por la exposición a sedimento fortificado con un compuesto desorganizador endócrino presente en el ambiente acuático (nonilfenol).
3. Evaluar el antisuero anti Vtg-B dirigido contra la proteína vitelogenina de *Cyprinus carpio* como herramienta para la detección de los efectos desorganizadores endócrinos de los compuestos evaluados en el presente capítulo sobre especies nativas.

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Bioensayos de intoxicación inducida

Se realizaron ensayos de intoxicación inducida por medio de una única inyección intraperitoneal (ip) bajo condiciones estándar de laboratorio como se ha sido descrito en el Capítulo 3 (ver sección 3.2.1a). Previamente a los ensayos los peces fueron aclimatados bajo condiciones controladas de laboratorio como se describe en la sección 3.2 (ver Figura 3.1). Se evaluaron las respuestas agudas de los biomarcadores propuestos frente a una dosis subletal de: 17β -estradiol (10 mg E2/kg p.c.) o nonilfenol (100 mg NP/kg p.c.) disueltos en aceite de maíz luego de 72 h de exposición. Estos ensayos se realizaron con ejemplares juveniles de la especie prueba estandarizada (*Cyprinus carpio*) con un p.c. de $17,4 \pm 0,5$ g y longitud total de

10,4 ± 0,1 cm (media ± ESM; n = 24); y la especie nativa *Pimelodella laticeps* con un p.c. de 1,4 ± 0,1 g y longitud total de 5,9 ± 0,1 (media ± ESM; n = 21).

Las dosis de E2 y NP se basaron en estudios que han reportado un efecto desorganizador endócrino luego de la inyección ip de estos compuestos (Christensen y col., 1999; Casini y col., 2002; Pérez Carrera y col., 2007).

5.2.2 Exposición a sedimentos fortificados con nonilfenol

Se evaluó el efecto adverso producido por la exposición a sedimento fortificado con NP. Se utilizó sedimento seco proveniente del arroyo Las Flores (sedimento de referencia) previamente procesado como se indicó en el Capítulo 3 (ver sección 3.2.1c). El sedimento fue fortificado con NP (Fluka, 85% de pureza basado en el contenido de p-isómeros con mezcla de compuestos con cadena lateral ramificada) utilizando una solución madre de en acetona (13 mg NP/ml) para lograr una concentración teórica de 3 mg NP/kg p.s. de sedimento. La solución madre fue agregada al sedimento seco como se describió en la sección 3.2.1c y permaneció mezclándose durante 20 días (ver Figura 3.4 A). La concentración fue seleccionada en base a bibliografía y a concentraciones reportadas en el ambiente (Meijide, 2007; Soares y col., 2008). Estos ensayos se realizaron con juveniles de *Cyprinus carpio* con un p.c. de 7,1 ± 0,3 g y una longitud total de 8,6 ± 0,1 cm (media ± ESM; n=20) y ejemplares de la especie nativa, *C. paleatus* con un p.c. de 3,3 ± 0,2 g y una longitud total de 5,9 ± 0,1 cm (media ± ESM; n=24). El diseño experimental utilizado fue descrito en el Capítulo 3 (ver Figura 3.4). Los peces fueron divididos al azar en los diferentes acuarios manteniendo una densidad de carga de 2,0 g p.c./L para *C. carpio* (n=10) y 1,8 g p.c./L para *C. paleatus* (n=12). Durante el ensayo, se tomaron muestras de agua donde se midieron parámetros fisicoquímicos básicos, material particulado en suspensión y muestras de sedimento donde se midieron las concentraciones efectivas del tóxico. Con el objeto de minimizar la degradación microbiana a las muestras se les agregó formaldehído hasta alcanzar una concentración del 1% (APHA, 2005), las muestras de sedimento luego se homogeneizaron y dejaron secar a temperatura ambiente. Luego de 21 días de exposición los peces fueron anestesiados, sacrificados y procesados como se describió en la sección 3.3 y las diferentes muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su procesado.

5.2.3 Parámetros evaluados

5.2.3.1 Parámetros biomarcadores

Se determinaron los índices fisiológicos (FC e IHS) tal como fueron descriptos en la sección 3.4.1. Se evaluaron los biomarcadores asociados a la biotransformación como la actividad enzimática de GST según ha sido descripto en la sección 3.4.2. Asociados al estrés oxidativo se evaluó la actividad enzimática de la CAT y SOD así como los niveles de TBARS siguiendo las condiciones ya descriptas en la sección 3.4.3. Por último en los bioensayos de intoxicación inducida se evaluó mediante inmunodetección la presencia de la proteína Vtg en plasma como biomarcador asociado a la presencia de compuestos desorganizadores endócrinos, según ha sido descripta en la sección 3.4.4. Para esto se utilizó el antisuero anti Vtg-B obtenido durante este trabajo de Tesis (ver Anexo).

5.2.3.2 Parámetros fisicoquímicos y determinación de NP en sedimento

Se registraron los parámetros fisicoquímicos básicos del agua de los acuarios a partir de muestras tomadas en al menos dos oportunidades a lo largo del período experimental. Se determinó el pH, la conductividad y el oxígeno disuelto (OD) por medio de electrodos de campo. En los ensayos prolongados se tomaron muestras de agua en el tiempo y se determinó la concentración de amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y fósforo reactivo soluble (PRS) mediante las técnicas especificadas en la sección 3.5. En los ensayos con sedimento también se evaluó el material particulado en suspensión (MPS) y la materia orgánica particulada (MOP) según han sido descriptas en la sección 3.5.

Las determinaciones de las concentraciones efectivas del NP en sedimento se realizaron en el laboratorio del Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIMA), Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Las muestras de sedimento fueron secadas al aire, homogeneizadas y tamizadas. Submuestras de 5 g se dispersaron con sulfato de sodio calcinado a 550 °C. La extracción del NP de los sedimentos se realizó por sonicación utilizando 3 contactos de metanol acidificado, como solvente de extracción en una relación 1:5 (sólido:solvente). Los extractos obtenidos fueron unificados y secados en corriente nitrógeno hasta sequedad. Las muestras fueron resuspendidas en 1 ml de agua: metanol (50:50) y filtradas por membrana de 0,45 micrones para su posterior análisis instrumental.

Para el análisis instrumental se utilizó un HPLC, marca Agilent, modelo 1100, acoplado a una columna de C18 usando como fase móvil una mezcla isocrática de metanol: fórmico 0,1% (90:10). Como detector se utilizó un espectrómetro de masas marca Agilent, modelo VL, con fuente de ionización ESI operando en modo negativo, por monitoreo del ion selectivo (SIM) de las especies moleculares [M-H], $m/z=219$ y sus fragmentos de $m/z=147$ y 133 . La especie más intensa se usó para cuantificar ($m/z=219$) y las transiciones de masas derivadas de ella para la confirmación de identidad. La validación del método se estudió por sobreagregado de NP a los niveles esperados en el ensayo, tanto en su proceso de almacenamiento como de recuperación analítica. De esta forma, submuestras de sedimento de referencia previamente hidratadas fueron fortificadas con una solución madre de NP en metanol. Luego se agregó formaldehído hasta alcanzar una concentración del 1%, se homogeneizaron y dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron de igual forma que las muestras.

5.2.4 Análisis estadístico

En el presente capítulo las diferencias estadísticas entre grupos expuestos a una única inyección ip se evaluaron mediante ANOVA de un factor y las comparaciones múltiples entre los distintos grupos experimentales se analizaron por medio de la prueba de Tukey ($p < 0,05$). En los ensayos de exposición a sedimento fortificado se utilizó un análisis de varianza, ANOVA de dos factores evaluando las diferencias entre los ejemplares expuestos a NP y los expuestos al sedimento control así como las diferencias entre especies prueba, seguido por la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

5.3 Resultados

5.3.1 Bioensayos de intoxicación inducida

Luego de la inducción de *C. carpio* y *P. laticeps* con NP y E2, no se detectaron diferencias significativas en ninguno de los índices fisiológicos respecto a los individuos control (Tabla 5.1). Sin embargo, se observó un incremento significativo en el FC de las carpas inyectadas con NP (29%) respecto a las inyectadas con E2. En la Figura 5.2 se muestran los resultados correspondientes a los parámetros bioquímicos evaluados en *C.*

carpio y *P. laticeps* (Figura 5.2 A). No se observaron diferencias significativas en la actividad de la GST de ninguna de las especies prueba. Respecto a la actividad antioxidante de la CAT, se evidenció una respuesta diferencial en ambas especies, detectando un incremento significativo del 45% en las carpas inyectadas tanto con NP como con E2 respecto a los ejemplares control; mientras que en los bagrecitos inyectados con NP se evidenció una disminución respecto a los ejemplares control y a los inyectados con E2 (-27%) (Figura 5.2 A). Como se puede apreciar en la Figura 5.2 B se evidenció un incremento significativo en la actividad de SOD de las carpas inyectadas tanto con NP (71%) como con E2 (34%) respecto a los individuos control. Al mismo tiempo no se observaron cambios significativos en los niveles de TBARS de *C. carpio* en ninguno de los dos tratamientos. La actividad enzimática de SOD y los niveles de TBARS no se pudieron determinar en las muestras de tejido hepático de *P. laticeps* ya que existieron inconvenientes por los cuales se perdió parte del material biológico, por lo tanto no fue suficiente para las necesidades metodológicas de ambas determinaciones.

Tabla 5.1. Índices fisiológicos de *Cyprinus carpio* y *Pimelodella laticeps* luego de la administración de una dosis subletal de NP o E2 en condiciones estándar de laboratorio.

Índices fisiológicos	<i>Cyprinus carpio</i>			<i>Pimelodella laticeps</i>		
	Co	NP	E2	Co	NP	E2
Factor de Condición	1,39±0,06 (14)	1,57±0,04 [#] (8)	1,22±0,03 (8)	0,64±0,03 (7)	0,69±0,04 (7)	0,66±0,01 (7)
Índice hepatosomático	2,03±0,06 (14)	2,04±0,09 (8)	2,38±0,12 (8)	1,55±0,15 (7)	1,55±0,14 (7)	1,42±0,09 (7)

Los datos se expresan como medias \pm ESM, entre paréntesis se indica el número de muestras. Co, peces inyectados con aceite de maíz; NP, peces inyectados con nonilfenol; E2, peces inyectados con 17 β -estradiol. Las diferencias estadísticas significativas entre los grupos para cada especie, se evaluaron mediante ANOVA ($p < 0,05$) y comparaciones múltiples Prueba de Tukey. (#) Indica diferencias significativas respecto a individuos inyectados con E2.

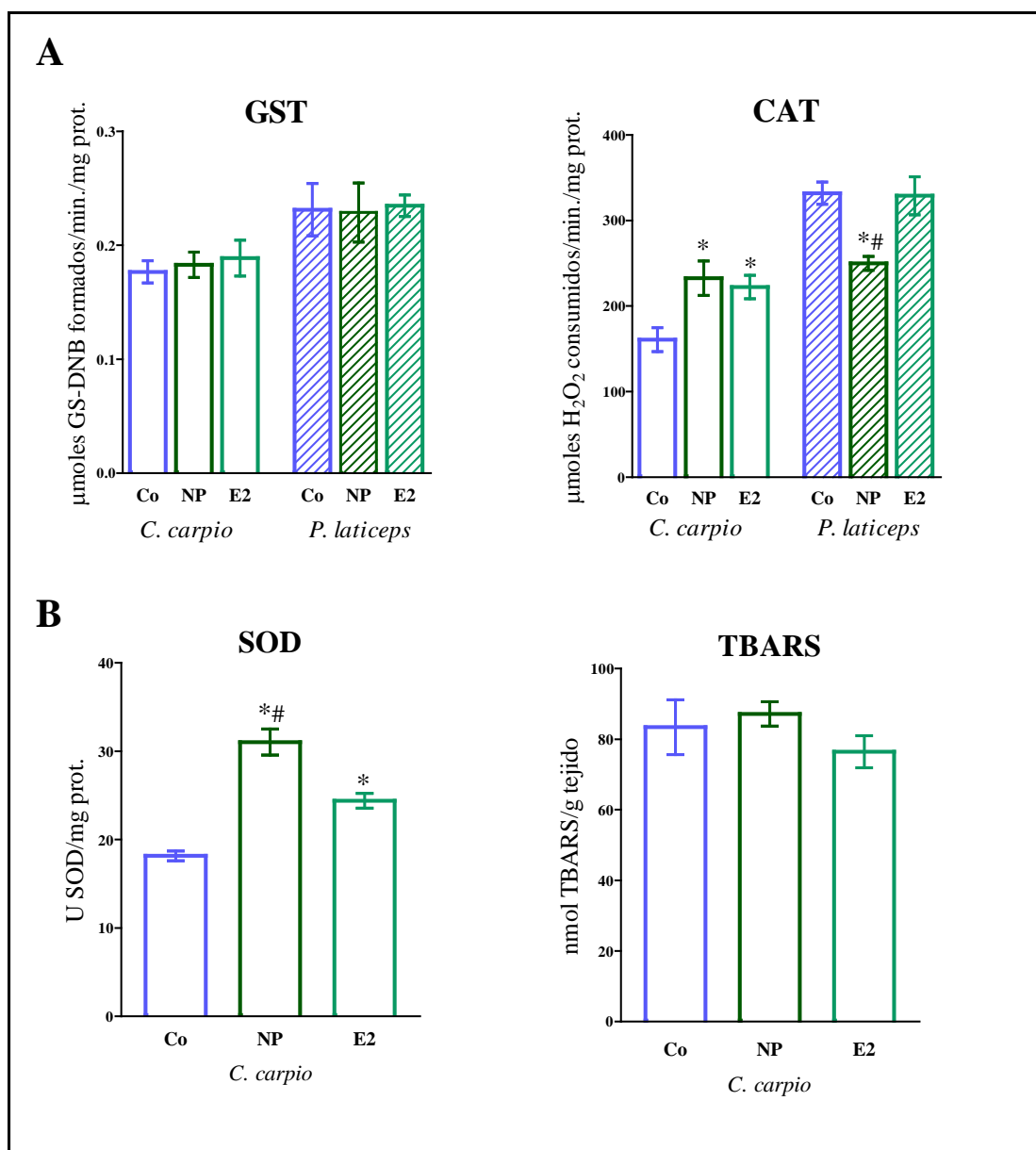


Figura 5.2. Biomarcadores bioquímicos evaluados luego de una dosis subletal de nonilfenol (NP) o 17 β -estradiol (E2) en *C. carpio* (A y B) y *P. laticeps* (A) bajo condiciones estándar de laboratorio; Co, peces inyectados con aceite de maíz. Los datos se expresan como medias \pm ESM; $n=8$ para los grupos experimentales y $n=14$ para Co. Las diferencias estadísticas significativas entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA ($p < 0,05$) y comparaciones múltiples (Prueba de Tukey) para cada especie. (*) Indica diferencias significativas respecto al control respectivo. (#) Indica diferencias significativas respecto al otro grupo experimental.

Los resultados de inmunodetección por *Western blot* de la proteína Vtg en muestras de plasma de juveniles de *C. carpio* revelaron la presencia de bandas reactivas de alto peso molecular (130-170 kDa) en las carpas inyectadas con E2 o con NP. Sin embargo, en las muestras de ejemplares inyectados con NP también se observaron bandas reactivas intensas de menor peso molecular. Por otro lado, no se observaron bandas reactivas en las muestras provenientes de peces inyectados con aceite de maíz (control, Co) (Figura 5.3). Por su parte, los resultados del análisis de *Western blot* de muestras de plasma de juveniles de *P. laticeps* no revelaron bandas reactivas en los ejemplares inyectados con E2 o con NP (resultados no mostrados). En base a los resultados obtenidos mediante la técnica de *Western blot* de muestras de plasma de juveniles de *P. laticeps* se procedió a evaluar el antisuero anti Vtg-B obtenido en el laboratorio contra muestras de otras especies nativas. Se inyectaron ejemplares juveniles de *Hypostomus commersoni*, *Cyphocarax voga*, *Hoplosternum littorale* y *Loricariichthys anus* con E2 o aceite de maíz, como se detalla en la sección 5.2.1, y se evaluó la presencia de la proteína Vtg por *Dot blot* y *Western blot* como se detalla en el Anexo y en el Capítulo 3 respectivamente. En la Figura 5.4 se presentan los resultados obtenidos en el *Dot Blot* donde se detectó una marca reactiva, indicativo de la presencia de Vtg, en las muestras de plasma de los ejemplares de *C. carpio* inyectados con E2, si bien en las muestras de plasma de *H. commersoni* inyectado con E2 se pudo detectar una marca muy tenue (posición B5), no se observaron marcas reactivas en las muestras de plasma correspondientes a las otras especies nativas. Como control positivo del ensayo de *Dot Blot* se utilizó la proteína Vtg-B purificada (ver Anexo), posición donde se evidencia una marca reactiva de gran intensidad. Con respecto a la inmunodetección de la proteína Vtg por medio de *Western blot*, se observaron bandas reactivas del tamaño esperado para la proteína Vtg sólo en las muestras de los ejemplares de *C. carpio* inyectados con E2 mientras que en ningún caso fue posible evidenciar bandas del peso molecular esperado en muestras de plasma correspondientes a las especies nativas (Figura 5.5). Si bien en las muestras correspondientes a los ejemplares de *H. commersoni* y *L. anus* inyectados con E2 se pueden observar bandas reactivas muy tenues, no serían específicas de Vtg ya que no coinciden con el PM esperado y además se detectaron en las muestras de los individuos inyectados con aceite de maíz (Co). Al comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas de inmunodetección se observan que los mismos se corresponden ya que las marcas reactivas que se observaron en las muestras de plasma de *C. carpio* en el *Dot Blot* coincidieron con las bandas del *Western blot* del peso

molecular de la Vtg. Por su parte la marca tenue detectada en la posición de la muestra de *H. commersoni* inyectada con E2 se evidenció también en el *Western blot* pero con un peso molecular menor.

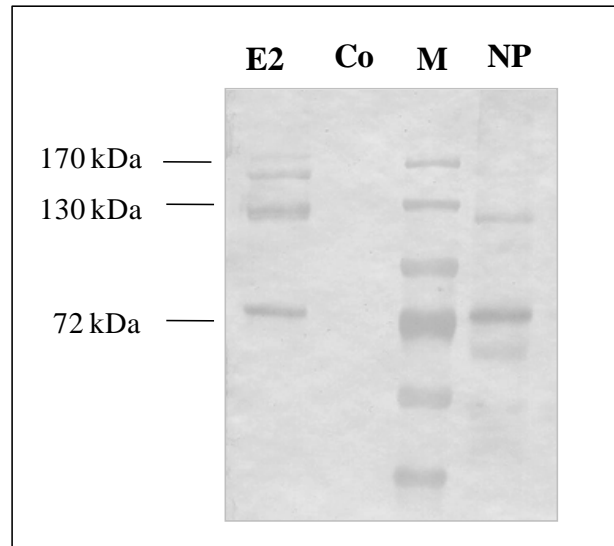


Figura 5.3. Inmunodetección por *Western blot* de la proteína Vtg en plasma de juveniles de *C. carpio*, luego de 72 h de exposición a 17 β -estradiol (**E2**), nonilfenol (**NP**) o aceite de maíz (**Co**). Se utilizó como anticuerpo primario el antisuero anti Vtg-B de *C. carpio*. M: marcador de peso molecular (*Page Ruler*TM. *Prestained Protein Ladder*, Fermentas)

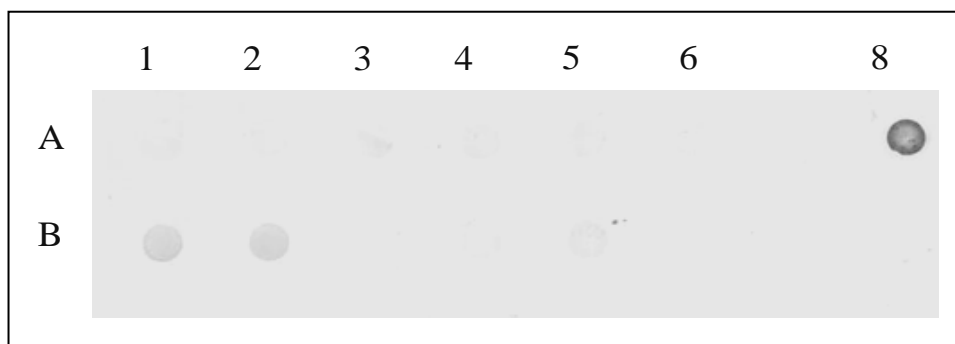


Figura 5.4. Inmunodetección por *Dot Blot* de la proteína Vtg en ejemplares juveniles de *C. carpio* y especies nativas, luego de 72 h de exposición a 17 β -estradiol (**B1 - B6**) o aceite de maíz (**A1 - A6**). Muestras de plasma, con 20 μ g de proteínas totales por pocillo, provenientes de *C. carpio* (**columnas 1 y 2**), *C. voga* (**columna 3**), *L. anus* (**columna 4**), *H. commersoni* (**columna 5**), *H. littorale* (**columna 6**) y 1 μ g de la proteína Vtg-B recombinante purificada (**columna 8**). Se utilizó como anticuerpo primario el antisuero anti Vtg-B de *C. carpio*.

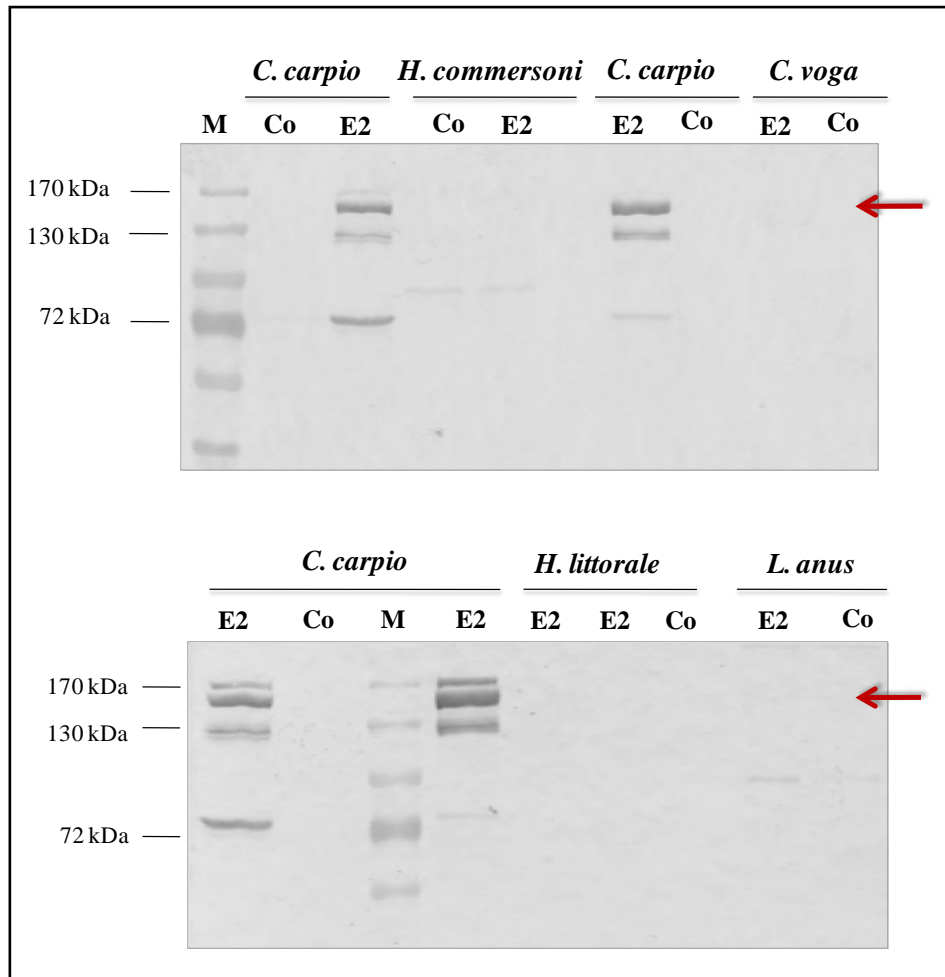


Figura 5.5. Inmunodetección por *Western blot* de la proteína Vtg en plasma de juveniles de *C. carpio*, *H. commersoni*, *C. voga*, *H. littorale* y *L. anus*, luego de 72 h de exposición a: 17 β -estradiol (**E2**) o aceite de maíz (**Co**). Se utilizó como anticuerpo primario el antisuero anti Vtg-B de *C. carpio*. M: marcador de peso molecular (*Page RulerTM. Prestained Protein Ladder*, Fermentas). La flecha indica la posición de la proteína Vtg de *C. carpio*.

5.3.2 Exposición a sedimentos fortificados con nonilfenol

La exposición a sedimento fortificado con NP luego de 21 días no evidenció cambios en los índices fisiológicos en ninguna de las dos especies prueba, aunque si se observó una diferencia interespecífica para ambos parámetros ($p < 0,05$) (Tabla 5.2). Las respuestas de los parámetros bioquímicos evaluados en *C. carpio* y *C. paleatus* se pueden observar en la Figura 5.6. Se evidenció un incremento significativo en la actividad enzimática de GST en los peces expuestos al sedimento fortificado con NP tanto para *C. carpio* (44%) como para *C. paleatus*

(47%). Respecto a los parámetros de estrés oxidativo se evidenció un incremento significativo en la actividad de la CAT sólo en las *Corydoras* expuestas al sedimento fortificado con NP, siendo éste 2,1 veces mayor que la actividad de las que permanecieron en el sedimento de referencia. Sin embargo, la actividad de la SOD se incrementó en los ejemplares expuestos a NP de ambas especies respecto a los controles (61% carpas y 60% *Corydoras*). Al mismo tiempo, se evidenció un incremento significativo en la LPO de ambas especies, observándose un aumento en los niveles de TBARS del 50% en las carpas y 2,5 veces mayor en las *Corydoras* expuestas al sedimento fortificado con NP respecto a los ejemplares control. También se observó una diferencia significativa en la respuesta de ambas especies en la actividad enzimática de la GST y SOD.

Tabla 5.2. Índices fisiológicos de *Cyprinus carpio* y *Corydoras paleatus* luego de 21 días de exposición a sedimento fortificado con nonilfenol en condiciones estándar de laboratorio.

Índices fisiológicos	<i>Cyprinus carpio</i>		<i>Corydoras paleatus</i>	
	S. Co	S. NP	S. Co	S. NP
Factor de Condición	1,11 ± 0,01 (10)	1,07 ± 0,03 (10)	1,52 ± 0,04 (10) #	1,52 ± 0,03 (10) #
Índice hepatosomático	1,31 ± 0,08 (10)	1,33 ± 0,08 (10)	0,67 ± 0,06 (10) #	0,70 ± 0,04 (10) #

Los datos se expresan como medias ± ESM, entre paréntesis se indica el número de muestras. S. Co, peces en acuario con sedimento control proveniente del arroyo Las Flores; S. NP, peces en acuario con sedimento fortificado con nonilfenol. Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0,05$). (#) Indica diferencias significativas respecto a la especie estandarizada *C. carpio*.

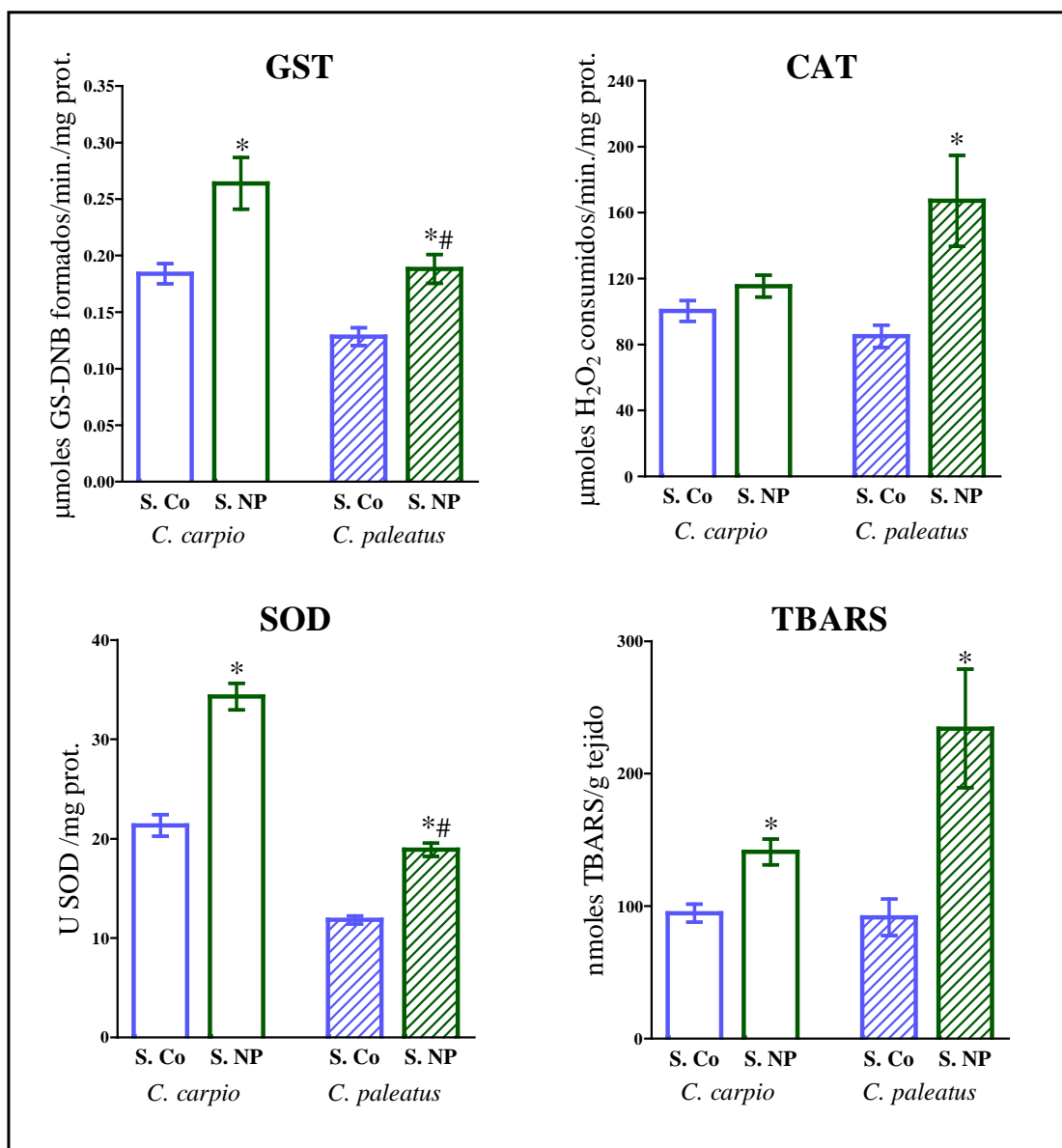






Figura 5.6. Biomarcadores bioquímicos de *C. carpio* y *C. paleatus* evaluados luego de la exposición a sedimento fortificado con nonilfenol bajo condiciones estándar de laboratorio. **S. Co**, peces en acuario con sedimento control proveniente del arroyo Las Flores; **S. NP**, peces en acuario con sedimento fortificado con nonilfenol. Los datos se expresan como medias \pm ESM; $n=10$ para cada grupo. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA de dos vías y comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0,05$). (*) Indica diferencias significativas respecto al control. (#) Indica diferencias significativas entre especies.

5.3.3 Parámetros fisicoquímicos y determinación de NP en sedimento

Los parámetros fisicoquímicos del agua evaluados durante el ensayo con sedimento fortificado con NP se presentan en la Tabla 5.3. Los niveles de OD se mantuvieron estables a lo largo del ensayo y sobre los niveles aceptables según Berón (1984). Al mismo tiempo, tanto el OD como el pH y la conductividad presentaron valores similares en todos los acuarios, para ambas especies prueba independientemente de la condición ensayada. Respecto a los nutrientes evaluados en el laboratorio no se observó una clara relación entre la concentración de estos parámetros y la presencia del NP en el sedimento, como tampoco en relación a la presencia de los peces, por ejemplo la concentración de NO_2^- fue mayor en el acuario sin peces. La presencia de peces también determinó un incremento en los niveles de MPS y MOP, siendo mayor en acuarios con sedimento fortificado con NP.

Tabla 5.3. Parámetros fisicoquímicos del agua de los acuarios de ensayos de exposición con sedimento fortificado con NP

Parámetros	<i>C. carpio</i>		<i>C. paleatus</i>		Sin peces
	S. Co 	S. NP 	S. Co 	S. NP 	S. NP
OD (mg/L)	7,97 ± 0,16	7,83±0,18	8,34±0,05	7,84±0,14	8,48±0,11
pH	8,76±0,04	8,76±0,05	8,87±0,04	8,77±0,04	8,93±0,06
Conductividad (μS/cm)	1030±23	1032±21	1037±23	1052±36	1018±14
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	1,97±1,30	1,74±1,11	0,53±0,02	1,87±1,06	0,75±0,41
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	0,29±0,14	0,43±0,24	0,26±0,08	0,31±0,22	0,53±0,15
PRS (mg/L)	0,45±0,32	0,23±0,13	0,27±0,13	0,18±0,09	0,15±0,07
MPS (mg/L)	367 ± 68	708 ± 400	277 ± 50	499 ± 104	52 ± 33
MOP (mg/L)	41 ± 7	80 ± 43	34 ± 4	61 ± 11	9 ± 5

Los datos se expresan como medias ± ESM, $n=3$. **S. Co**, acuarios con sedimento control; **S. NP**, acuarios con sedimento fortificado con nonilfenol.

Por último, se determinaron las concentraciones medias efectivas del NP en el sedimento de los diferentes acuarios. Los niveles de NP detectados en el sedimento de referencia tanto del acuario de *C. carpio* ($3,4 \pm 4,6$ ng/g p.s.) como de *C. paleatus* ($6,5 \pm 0,2$ ng/g p.s.) fueron sustancialmente menores respecto a los niveles guía sugeridos por Canadá (1400 ng/g; CCME, 1999-2002). Por su parte, las concentraciones de NP en los acuarios con sedimento fortificado a lo largo del período ensayado fueron similares para ambas especies prueba, siendo $14,6 \pm 4,6$ ng/g p.s. para *C. carpio* y $15,3 \pm 1,9$ ng/g p.s. para *C. paleatus*, las cuales a su vez fueron similares a la concentración del acuario sin peces ($13,9 \pm 5,1$ ng/g p.s.). En todos los casos las concentraciones se expresan como media \pm ESM ($n=3$). Debe mencionarse que a pesar de que el procesado de las muestras previó la degradación del NP, los resultados obtenidos indicarían una degradación del mismo. A su vez, los resultados obtenidos en el ensayo de prueba evidenciaron que durante el proceso de secado de las muestras de sedimento se pierde el 50% de NP respecto de la concentración teórica inicial.

5.4 Discusión

Si bien el NP es conocido por su efecto como desorganizador endócrino, se dispone de menor información respecto a los posibles efectos adversos originados sobre los procesos de biotransformación y generación de especies reactivas de oxígeno (EROs). En el presente trabajo, los índices fisiológicos (FC, IHS) de las especies prueba analizadas no evidenciaron modificaciones luego de la exposición a E2 y NP por inyección peritoneal, ni por exposición a sedimento fortificado con NP. Una respuesta similar fue reportada por Pérez Carrera y col. (2007) luego de la exposición por medio de una inyección ip tanto con la misma dosis de NP utilizada en este trabajo (100 mg/kg) como con una dosis superior (200 mg/kg). Por su parte, los mismos autores evidenciaron un incremento en el IHS de ejemplares inyectados con la misma dosis de E2 que la utilizada en este estudio (10 mg/kg) cuando la exposición fue prolongada en el tiempo (10 días). Es probable que en el presente estudio el tiempo de exposición (72 h) de los ejemplares inyectados no haya sido suficiente para evidenciar cambios en los índices fisiológicos, sin embargo luego de la exposición más prolongada a sedimento fortificado tampoco se observaron cambios significativos en los índices. De manera similar Mitchelmore y Rice (2006) tampoco detectaron diferencias significativas en el

FC respecto a ejemplares recolectados de sitios de referencia en estudios realizados a campo con ejemplares de *C. carpio* recolectados de sitios afectados por el impacto de plantas de tratamiento, donde se detectó la presencia de NP y NPEs.

Respecto a los biomarcadores bioquímicos evaluados, luego de la exposición a NP y E2 inyectados intraperitonealmente no se observaron cambios significativos en la actividad de GST. En cambio, la exposición a sedimento fortificado con NP produjo un incremento significativo en la actividad de esta enzima tanto en *C. carpio* como en *C. paleatus*. Se han reportado respuestas diferenciales en la actividad de esta enzima de fase II respecto a la exposición a E2 y NP así como a la forma de administración del tóxico y al tiempo de exposición. Se ha observado una inhibición de la actividad de GST tiempo y dosis dependiente frente a la inyección ip de E2 (Vaccaro y col., 2005; Pérez Carrera y col., 2007) sin embargo no se han evidenciado cambios frente a la exposición a NP (Vaccaro y col., 2005). La respuesta frente a NP coincide con nuestros resultados encontrados en los ensayos de inyección con dosis y tiempos de exposición comparables. Al mismo tiempo, un incremento en la actividad de esta enzima ha sido observada en respuesta a NP en *Onchorynchus mykiss* luego de una semana de exposición al tóxico en agua (Uguz y col., 2003), en *Sparus auratus* luego de una exposición conjunta a E2 y NP disueltos en agua (Teles y col., 2005) y en la misma especie luego de la inyección ip (Pérez Carrera y col., 2007). En este último caso, la exposición fue más prolongada en el tiempo (10 días) la cual podría asemejarse a la exposición a sedimento fortificado con NP de este trabajo. Pérez Carrera y col. (2007) atribuyen este comportamiento diferencial de la GST luego de la exposición a E2 o NP a las vías alternativas del metabolismo de estos dos compuestos estrogénicos. Así mismo, las diferentes dosis y vías de exposición (inyección ip, exposición en agua y sedimento) son factores a considerar como moduladores de las respuestas incluso para una misma especie.

Las enzimas antioxidantes evidenciaron diferentes cambios dependiendo de la especie y el tipo de exposición. La actividad de la CAT evidenció un incremento significativo en *C. carpio* luego de la inyección ip de NP y E2 y en *C. paleatus* por exposición a sedimento fortificado con NP. Al mismo tiempo, se observó una disminución en su actividad en *P. laticeps* por el efecto del NP y no se observaron cambios por la exposición a sedimento fortificado con el mismo compuesto en *C. carpio*. Se evidenció además un incremento en la

actividad de la SOD de *C. carpio* luego de la exposición a E2 y NP tanto por medio de una inyección ip como por exposición a sedimento fortificado con NP. Respecto a esta última forma de exposición, se observó la misma respuesta en la especie nativa (*C. paleatus*). Una disminución en la actividad de CAT también ha sido reportada por otros autores luego de la exposición a E2, sin encontrar diferencias significativas por el efecto de la exposición a NP (Pérez Carrera y col., 2007). Sin embargo, en general se observó un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes evaluadas principalmente luego de la exposición a sedimento fortificado con NP en *C. paleatus*. A su vez, en este tipo de exposición se observó un importante incremento en los niveles de TBARS evidenciando daño oxidativo a nivel de lípidos, sin embargo en la exposición por medio de inyección ip no se observaron cambios a nivel de LPO. Esto último podría estar relacionado con las respuestas halladas en las enzimas antioxidantes y con los tiempos de exposición. Por lo tanto, la ausencia de daño oxidativo en *C. carpio* luego de la inyección ip de E2 y NP podría explicarse tanto por el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes como por el corto período de exposición (72 h). Por su parte, luego de la exposición a sedimento fortificado con NP el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes no fue suficiente para prevenir el daño oxidativo evidenciado en ambas especies prueba ya que en este caso fue una exposición más prolongada en el tiempo (21 días).

La inmunodetección de los niveles de Vtg plasmáticos ha sido utilizada como parámetro biomarcador asociado a la exposición de compuestos desorganizadores endócrinos estrogenizantes tales como APEs y sus metabolitos persistentes entre los que se encuentra el NP. La exposición de peces a este tipo de compuestos bajo condiciones de laboratorio evidencia una inducción de Vtg tanto concentración como tiempo dependiente (Casini y col., 2002; Vaccaro y col., 2005; Kirby y col., 2007; Genovese y col., 2011). De acuerdo con esto, se observó una inducción en los niveles de Vtg en *C. carpio* luego de la inyección ip con E2 y NP, evidenciado por la presencia de bandas reactivas del peso molecular esperado para la Vtg (130-170 kDa). Sin embargo, en los ejemplares expuestos al NP se observó la presencia de bandas reactivas adicionales de menor peso molecular. Patrones similares han sido descritos en otras especies de teleósteos expuestas a diferentes compuestos xenoestrógenos similares al NP (octilfenol, OP; etinilestradiol). La presencia de estas bandas podrían ser atribuidas a subproductos de la degradación de la proteína Vtg ya que la estabilidad de esta

fosfoglicoproteína de alto peso molecular es variable entre las distintas especies, siendo en algunas altamente estable evidenciando una única banda inmunorreactiva por *Western blot*, mientras que en otras se pueden detectar bandas adicionales, sugiriendo una mayor labilidad de Vtg (Hennies y col., 2003; Rey Vazquez y col., 2009). Por su parte, un patrón diferencial de bandas evidenciado por medio de la técnica *Western blot* de muestras de plasma de hembras estrogenizadas (E2) de *Cichlasoma dimerus* respecto a muestras de machos inducidos con OP ha sido atribuido a una probable inducción diferencial de E2 y OP, relacionada con la potencia estrogénica de estos dos compuestos (Genovese y col., 2011 y 2012). Respecto a los resultados obtenidos del análisis de *Western blot* de muestras de plasma de juveniles de las diferentes especies nativas (*P. laticeps*, *H. littorale*, *H. commersoni*, *L. anus* y *C. voga*) no se observaron bandas reactivas ni en los ejemplares inyectados con E2 ni con NP, indicando que el antisuero anti-Vtg-B de carpa no posee reactividad cruzada con las proteínas Vtg de las especies nativas evaluadas. Por lo tanto, estos resultados indican que el antisuero anti-Vtg-B obtenido durante este trabajo de Tesis es de utilidad para la detección específica de Vtg sólo en muestras provenientes de *C. carpio*. Teniendo en cuenta que el antisuero se obtuvo contra un fragmento de la proteína Vtg (ver Anexo) que no debe estar altamente conservado entre las carpas y las especies nativas en estudio, se podrían obtener nuevos antisueros contra los otros fragmentos de Vtg expresados en bacterias (A o F, ver Anexo) o contra la proteína Vtg completa.

Finalmente, los niveles de NP detectados en los ensayos con sedimento fortificado fueron considerablemente menores a lo esperado así como a los niveles guía de Canadá (CCME, 1999-2002). Trabajos previos han reportaron la resistencia a la biodegradación del NP en sistemas agua/sedimento, mostrando sólo una ligera pérdida de 9% luego de 56 días y de 4,2% después de 28 días (Lalah y col., 2003), así como la alta persistencia en sedimentos evaluada en estudios de laboratorio y campo (Bettinetti y col., 2002, Heinis y col., 1999). Así mismo, teniendo en cuenta la posible degradación microbiana del mismo se tomaron los recaudos necesarios en el momento de la toma de las muestras de sedimento y en las determinaciones del compuesto (ver sección 5.3.3), por lo tanto una posible interpretación sería la disminución de la concentración de NP durante el período de ensayo. Sin embargo, esta última interpretación no concuerda con los resultados biológicos obtenidos, ya que se evidenciaron notables cambios en la respuesta de los biomarcadores tanto a nivel de

biotransformación de fase II como de estrés oxidativo en ambas especies prueba. Así mismo, las respuestas en los parámetros biomarcadores son similares a las evidenciadas luego de la administración de una inyección ip de NP, principalmente a nivel de las enzimas antioxidantes. Otra posible interpretación de los resultados respecto a los niveles de NP observados en el sedimento podría surgir de los resultados obtenidos por Lalah y col. (2003) quienes reportaron que mezclas de NP donde predominen los isómeros ramificados mostraron ser más persistentes en los medios acuosos y menos persistentes en sedimentos y macrófitas debido a sus propiedades físicoquímicas, por disipación a través de la difusión, la partición y la volatilización en relación a los isómeros de NP de cadena lineal. Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos en este capítulo surge la necesidad de realizar nuevos ensayos que nos permitan confirmar los niveles de NP obtenidos en las determinaciones en sedimento. Además se considerará la evaluación de los niveles de NP en agua y MPS, de esta forma analizar la partición del mismo en los distintos compartimentos.

CAPÍTULO 6

**Efecto de los bifenilos policlorados (PCBs) y mezclas de
COPs sobre las respuestas de los biomarcadores**

6.1 Introducción

Otra clase de compuestos orgánicos persistentes en el ambiente es el de los bifenilos policlorados (PCBs), son un grupo de compuestos químicos sintéticos, contaminantes ambientales ubicuos y persistentes que se encuentran representados por mezclas complejas de 209 posibles congéneres. Cada uno de los cuales puede tener entre 1 y 10 átomos de cloro (Cl), variando en número y posición en la molécula de bifenilo. Se denominan "homólogos" a todos los PCBs con el mismo número de átomos de cloro (por ejemplo, tri, tetra, pentacloro-bifenilos, etc). De esta forma, según el número de sustituciones cloradas que presentan, los congéneres suelen denominarse "livianos" (entre 1 a 4 cloros) o "pesados" (desde 5 a 10 cloros). Las sustituciones de los átomos de hidrógeno por Cl en los carbonos que se encuentran en las posiciones 2, 2', 6, 6' de la molécula de bifenilo se denominan posiciones *orto*; las de los carbonos 3, 3', 5, y 5' se denominan posiciones *meta*, y por último los de las posiciones 4 y 4' se denominan *para* (Figura 6.1).

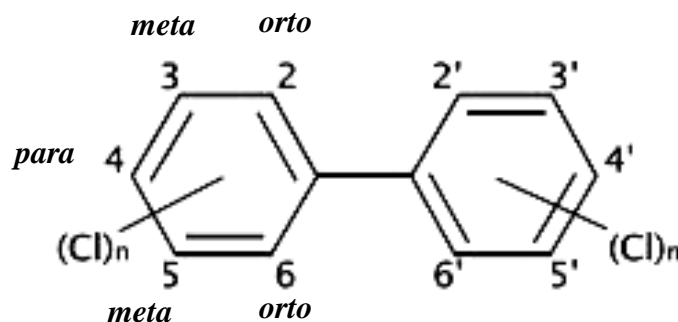


Figura 6.1 Estructura química de los bifenilos policlorados (PCBs) y sistema de sustitución numérica de átomos de cloro.

A su vez, los anillos de benceno pueden girar alrededor del enlace C-C que conecta los mismos permitiendo dos tipos de configuraciones: plana, los dos anillos de benceno en el mismo plano y aquella en la que los anillos están en un ángulo de 90° entre sí. La configuración plana está determinada por el número y posición de la sustitución permitiendo clasificar a los congéneres de la siguiente manera:

- No-coplanares, congéneres con dos o más sustituciones en posición *orto* las cuales debido a la repulsión e impedimento estérico de los átomos de cloro, de mayor tamaño que los

de hidrógeno impiden la libre rotación de los anillos de benceno manteniéndolos en diferentes planos.

- Coplanares, congéneres con sustituciones de cloro en las posiciones *meta* y *para* y sin sustituciones en las posiciones *orto* (PCBs no-*orto* sustituidos) o con una única sustitución en esta posición (PCBs mono-*orto* sustituidos). Entre los primeros se encuentran los congéneres 77 (3,3',4,4'-tetra-clorobifenilo), 126 (3,3',4,4',5-pentaclorobifenilo) y el PCB 118 mono-*orto* sustituido (2,3',4,4',5-pentaclorobifenilo).

Por lo tanto, dependiendo de la posición y el número de sustituciones de átomos de cloro los congéneres de PCBs individuales difieren en sus propiedades fisicoquímicas y en su toxicidad. Dichas propiedades influyen en la acumulación, absorción y el metabolismo de estos compuestos en el medio ambiente y en los organismos allí presentes, observándose un espectro complejo de respuestas biológicas y tóxicas en modelos *in vivo* e *in vitro* (Bonfeld-Jørgensen y col., 2001). Los PCBs mono- y no-*orto* sustituidos tienen mayores capacidades de adsorción a superficies orgánicas que otros congéneres, por lo tanto su distribución ambiental y dinámica en la cadena trófica puede diferir de otros homólogos (Metcalf y Metcalf, 1997). A su vez esta configuración, al igual que en las dioxinas y furanos, le permite interactuar con diferentes receptores celulares produciendo efectos tóxicos a muy bajas concentraciones. La toxicidad de los PCBs coplanares, se centra en su afinidad y capacidad de actuar como ligandos del receptor Arilo hidrocarbonado (Ahr) que finalmente induce la síntesis de la proteína CYP1A (Schlezing y Stegeman, 2000). En particular el 3,3',4,4',5-pentaclorobifenilo (PCB-126) ha sido reportado como uno de los congéneres más tóxicos en peces con un factor de toxicidad equivalente (TEF) de 0,1 indicando que este PCB es aproximadamente una décima parte tan potente como la dioxina (TCDD) (Metcalf y Metcalf, 1997). Al mismo tiempo tanto el PCB 126 como el PCB77 están entre los congéneres agonistas del Ahr más potentes y tóxicos (Van Veld y Nacci, 2008) inductores del citocromo P450 (CYP1A) y de la actividad de las monooxigenasas y por lo tanto se ha identificado como un problema ambiental (Huuskonen y col., 1996; Palace y col., 1996; Schlezing y col., 2006).

Debido a sus propiedades fisicoquímicas, a su naturaleza no inflamable, estabilidad y características de aisladores estos compuestos han sido utilizados en numerosos productos industriales tales como disolventes, fluidos hidráulicos, fluidos dieléctricos para capacitores y transformadores, etc. (Bonfeld-Jørgensen y col., 2001). Los PCBs han sido comercializados

en diferentes mezclas entre las que se encuentran las denominadas Aroclor, las cuales se identifican por un código de cuatro dígitos en el que los dos primeros dígitos indican el tipo de mezcla y los dos últimos indican el contenido de cloro aproximado en peso expresado en porcentaje. En nuestro país, las mezclas comerciales más utilizadas han sido el Aroclor 1254 y 1260 las cuales tienen una composición dominada por PCBs tetra-, penta- y hexa-clorados, con un contenido medio de cloro del 54 y 60% respectivamente (Aizpún de Moreno y col., 2004). El impacto adverso de la contaminación antrópica por este tipo de compuestos se evidencia en diversos cuerpos de agua de la Provincia de Buenos Aires. En particular, las costas del estuario del Río de la Plata a lo largo de la zona comprendida entre la Ciudad de Buenos Aires y La Plata, la composición de PCBs en el sedimento ha sido caracterizada por Colombo y col. (2005a) quienes determinaron la presencia mayoritaria (67%) de 13 congéneres de 3-4 a 7 átomos de cloro, evidenciando una importante contribución la mezcla de Aroclor 1254:1260 en una proporción de 1:3 respectivamente.

Al mismo tiempo, en los ecosistemas acuáticos la toxicidad de cada poluyente puede verse afectada por la presencia de otros y dar origen a interacciones químicas que pueden tener profundas consecuencias ya que los organismos, incluyendo peces, están expuestos a mezclas complejas de contaminantes ambientales (Brian y col., 2005). Los efectos de las interacciones entre compuestos químicos dentro de una mezcla sobre la biota son complejos y dependen tanto de los componentes de la mezcla, de las características de las sustancias químicas, de las concentraciones y del organismo prueba. Para los organismos que están expuestos a combinaciones de sustancias tóxicas al mismo tiempo existen tres tipos de respuestas posibles: aditiva, sinérgica, o antagonista (Abel, 1989). Se ha reportado que ciertos congéneres coplanares de PCBs poseen en los peces capacidad anti-estrogénica o también agonista del receptor Ahr (Vaccaro y col., 2005; Gunawickrama y col., 2008).

En este contexto se seleccionó un PCB coplanar no-*orto* sustituido (PCB126) y una mezcla comercial de PCBs cuya presencia fue reportada en el Río de la Plata (Aroclor 1254:1260) y así evaluar su efecto luego de una exposición aguda y prolongada en el tiempo, siendo esta última a través de sedimento fortificado. Al mismo tiempo, se evaluaron las posibles interacciones que pueden ocurrir en el ambiente acuático entre los diferentes tipos de COPs analizados en el presente trabajo (HAPs, desorganizadores endócrinos y PCBs). Por su parte, los efectos biológicos provocados por estas sustancias son susceptibles de ser evaluados mediante parámetros biomarcadores, principalmente a nivel de biotransformación.

6.1.1 Hipótesis y Objetivos

Hipótesis:

La exposición de las distintas especies prueba a los PCBs (coplanar y mezcla de Aroclor) promoverá una respuesta diferencial de los biomarcadores propuestos, principalmente a nivel de la biotransformación.

La administración conjunta del PCB coplanar con un hidrocarburo aromático policíclico o con un compuesto desorganizador endócrino producirá una mayor respuesta en el primer caso y antagónica en el segundo.

La respuesta de los parámetros provocada por la exposición de los organismos prueba al sedimento fortificado con Aroclor será diferencial y permitirá distinguir el aporte predominante de este tipo de tóxico al evaluar muestras ambientales.

Objetivos:

1. Estudiar el efecto de compuestos bifenilos policlorados sobre las respuestas de los biomarcadores propuestos.
2. Estudiar el efecto de un inductor específico de respuesta del sistema citocromo P450, bifenilo policlorado (PCB) coplanar y comparar con la respuesta ejercida por una mezcla de PCBs (Aroclor 1254:1260) presente en el ambiente.
3. Evaluar la interacción de un PCB coplanar con un desorganizador endócrino (17 β -estradiol) y un hidrocarburo aromático policíclico (benzo(a)pireno) por medio de la co-exposición de estos tóxicos.
4. Evaluar el efecto adverso producido por la exposición a sedimento fortificado de una mezcla de PCBs presente en el ambiente (Aroclor 1254:1260) bajo condiciones de laboratorio.

6.2 Materiales y Métodos

6.2.1 Bioensayos de intoxicación inducida por medio de inyección intraperitoneal con PCB126 y mezclas de COPs

Estos ensayos fueron del tipo *flow through*, estableciendo un sistema de flujo continuo con agua de red no clorada y bajo condiciones estándar con un fotoperíodo 12/12h D/N y temperatura (20 ± 1 °C) como se detalló en el capítulo 3 (ver sección 3.2.1a). Los tóxicos fueron administrados por medio de una única inyección intraperitoneal disueltos en aceite de maíz. Los individuos control solo recibieron aceite de maíz en la misma relación y luego de 48 h de exposición los peces fueron sacrificados y procesados como se detalla en la sección 3.3. Previamente a los ensayos los peces fueron aclimatados bajo condiciones controladas de laboratorio como se describe en la sección 3.2 (ver Figura 3.1)

Se evaluó el efecto de un PCB coplanar (PCB 126) y la interacción con un HAPs presente en el ambiente (benzo(a)pireno, BaP) y con un compuesto desorganizador endócrino (17 β -estradiol, E2) sobre los biomarcadores propuestos. Se empleó una dosis subletal de 10 μ g PCB126/kg p.c. disuelto en aceite de maíz (Vaccaro y col., 2005). La solución a inyectar fue preparada en el momento a partir de una solución madre de 2,5 mg PCB126/ml de hexano, se realizó una solución intermedia disuelta en aceite de maíz con el objeto de disminuir la proporción de hexano siendo finalmente despreciable (0,04%) en la solución final a inyectar. Para las mezclas se utilizaron las mismas dosis subletales con las que fueron inyectados cada tóxico en forma individual (ver Capítulos 4 y 5). Los peces se dividieron al azar en cuatro grupos experimentales ($n=10$) de la siguiente manera:

PCB, peces inyectados con 10 μ g PCB126/kg p.c.

Mz 1, peces inyectados con la mezcla 10 μ g PCB126/kg + 10 mg BaP/kg p.c.

Mz 2, peces inyectados con la mezcla 10 μ g PCB126/kg + 10 mg E2/kg p.c.

Co, peces inyectados con aceite de maíz

Estos ensayos se realizaron con ejemplares juveniles de *C. carpio* con un p.c. de $4,8 \pm 0,1$ g y longitud total de $7,4 \pm 0,1$ (media \pm ESM; $n=40$).

6.2.2 Exposición a sedimentos fortificados con mezclas de PCBs

Se evaluó el efecto adverso de una mezcla comercial de Aroclor luego de 21 días de exposición de las especies prueba a sedimento fortificado con la misma. Al igual que el resto de los ensayos tipo *spiked* se utilizó el sedimento superficial del arroyo Las Flores, extraído y procesado como se describió en el Capítulo 3 (ver sección 3.2.1c). El sedimento de referencia fue fortificado con una mezcla de Aroclor[®] 1254:1260 (1:3) disuelta en acetona para lograr una concentración inicial teórica de 210 ng/g p.s. expresado como Σ PCBs. La concentración fue seleccionada en base a bibliografía y a concentraciones reportadas en el ambiente (Zhou y Wong, 2000; Aizpún de Moreno y col., 2004 y Colombo y col., 2005a). Estos ensayos se realizaron con juveniles de *C. carpio* ($n = 20$; $5,1 \pm 0,4$ g p.c.) y de la especie nativa *Corydoras paleatus* ($n = 22$; $2,7 \pm 0,2$ g p.c.). El diseño experimental de estos ensayos fue similar al resto de los ensayos con sedimento fortificado que se describe en el Capítulo 3 (ver sección 3.2.1c) con la diferencia que los ensayos con las dos especies no se realizaron en forma contemporánea. En primer lugar inmediatamente después del fortificado del sedimento se llevó a cabo la exposición de *C. carpio* y posteriormente la de *C. paleatus*, el sedimento fortificado permaneció a -20°C hasta su utilización. En el comienzo de cada uno de estos ensayos, los peces fueron divididos al azar en los diferentes acuarios manteniendo una densidad de carga de 1,7 g p.c./L para *C. carpio* ($n=10$) y 1,5 g p.c./L para *C. paleatus* ($n=11$). Antes de comenzar cada uno de los ensayos se tomó una muestra por duplicado del sedimento para determinar la concentración efectiva de cada exposición, la cual fue considerada como la concentración inicial.

Una vez finalizado cada período de exposición los peces fueron anestesiados, sacrificados y procesados como se describió en la sección 3.3 y las diferentes muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su procesado.

6.2.3 Parámetros evaluados

6.2.3.1 Parámetros biomarcadores

Se determinaron los índices fisiológicos (FC e IHS) tal como fueron descritos en la sección 3.4.1. Se evaluaron los biomarcadores asociados a la biotransformación como la

actividad enzimática de GST y la inmunodetección de la proteína CYP1A según han sido descritos en la sección 3.4.2. Por último de los parámetros asociados al estrés oxidativo se evaluó la actividad enzimática de la CAT y SOD así como los niveles de TBARS siguiendo las condiciones ya descritas en la sección 3.4.3.

6.2.3.2 Parámetros fisicoquímicos y determinación de PCBs en sedimento

En el presente capítulo, en los ensayos con sedimento fortificado se registraron los parámetros fisicoquímicos básicos del agua de los acuarios, se determinó el pH, la conductividad y el oxígeno disuelto (OD) por medio de electrodos de campo. Se tomaron muestras de agua al inicio, a la mitad y al finalizar los ensayos y se determinó la concentración de amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y fósforo reactivo soluble (PRS) mediante las técnicas especificadas en la sección 3.4. Al mismo tiempo, se evaluó el material particulado en suspensión (MPS) y la materia orgánica particulada (MOP) según han sido descritas en la sección 3.4.

Previo a la implementación de los ensayos tipo *spiked* se determinó la presencia de PCBs en el sedimento del A° Las Flores. Posteriormente durante los ensayos se tomaron muestras de sedimento en tres tiempos como se detalló en el Capítulo 3 (sección 3.2.1 c) y se determinaron las concentraciones efectivas de las mezclas de PCBs. El análisis cuali-cuantitativo de PCBs se realizó en el laboratorio de Ecotoxicología de la UNMdP. Se determinó la presencia de los congéneres tri, tetra, penta, hexa, hepta y octa-clorinados de PCBs. Las muestras de sedimento seco fueron homogeneizadas y submuestras de 5 g se molieron con sulfato de sodio anhidro y se extrajeron con una mezcla 50:50 de hexano y cloruro de metileno en un aparato Soxhlet (Melville, Nueva Jersey, EE.UU.) durante 8 h. Los extractos obtenidos se concentraron en atmósfera de nitrógeno hasta 2 ml y se sometieron a cromatografía en sílica gel activada utilizando como eluyente hexano como ha sido descrito previamente por Metcalfe y Metcalfe (1997). La determinación cuali-cuantitativa se realizó por medio de cromatografía gaseosa con detector de captura electrónica (GC-ECD). Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu-17A equipado con detector de ^{63}Ni y columna capilar DB-5 de Supelco, de 0,25 mm de diámetro interno, 0,25 μm de espesor de fase, 30 m. de longitud y operada en modo "*splitless*" a 275 °C. El transporte de los compuestos dentro de la columna

capilar se realizó por medio de Helio AP, con velocidad de 1,5 ml/min. (Miglioranza y col., 2003). La identificación y cuantificación se realizó de acuerdo los tiempos de retención relativa (RRT) del PCB #103 utilizado como estándar interno (Ultra Scientific, RI, USA). En las muestras de los ensayos tipo *spiked* únicamente se determinó la presencia de los congéneres tetra, penta, hexa y hepta-clorinados de PCBs. Los congéneres analizados fueron los siguientes según nomenclatura IUPAC: 52, 44, 66, 95, 101, 110, 123, 149, 118, 153, 138, 187, 180; los cuales fueron considerados en la sumatoria (Σ PCBs) y a los que se hace referencia como PCBs totales, ya que son los congéneres que se encuentran más representados en las mezclas de Aroclor utilizadas. La extracción y purificación de los PCBs se realizó de acuerdo a la metodología de Metcalfe y Metcalfe (1997) con modificaciones de Miglioranza y col. (2003).

6.2.4 Análisis estadístico

En el presente capítulo las diferencias estadísticas entre grupos expuestos a una única inyección intraperitoneal se evaluaron mediante ANOVA de un factor y las comparaciones múltiples entre los distintos grupos experimentales se analizaron por medio de la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Por su parte, en los ensayos de exposición a sedimento fortificado las diferencias estadísticas entre los ejemplares expuestos a la mezcla de PCBs y los expuestos al sedimento control se evaluaron mediante el *test t* de Student ($p < 0,05$). Este análisis se realizó para cada especie por separado dado que los ensayos no fueron contemporáneos.

6.3 Resultados

No se observó mortalidad durante el período experimental en ninguno de los grupos de los ensayos realizados, confirmando que las dosis empleadas de PCBs y las mezclas fueron subletales para los ejemplares de las especies prueba.

6.3.1 Bioensayos de intoxicación inducida por medio de inyección intraperitoneal con PCB126 y mezclas de COPs

En la Tabla 6.1 se observan los índices fisiológicos de *C. carpio* luego de la exposición al PCB126 y mezclas con BaP y E2; no se detectaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales. En la Figura 6.2 se indican los resultados obtenidos para los parámetros bioquímicos evaluados en *C. carpio* luego de la inducción con el PCB126 y mezclas de COPs. No se observaron cambios significativos en la respuesta de la GST en ninguno de los tratamientos, sin embargo las enzimas antioxidantes presentaron diferentes respuestas frente al PCB y las mezclas ensayadas. La actividad de la CAT disminuyó significativamente luego de la inducción con el PCB126 (-18%) mientras que se evidenció un incremento significativo con Mz 2 (25%) respecto a los ejemplares control. A su vez se evidenció un incremento en la actividad de esta enzima en las carpas que recibieron ambas mezclas en comparación con los ejemplares inyectados con PCB (42% Mz 1 y 52% Mz 2). Respecto a la actividad enzimática de SOD se observó un incremento significativo en las carpas inyectadas con la mezcla de PCB+BaP (Mz 1) respecto a los peces control (57 %) a los inyectados con el PCB126 (66%) y a los que recibieron la Mz 2 con E2 (32%). El daño oxidativo a nivel de lípidos se evidenció por el incremento significativo en los niveles de TBARS tanto en las carpas inyectadas con el PCB 126 (54%) como con la mezcla de PCB+BaP (66%) respecto a los ejemplares control (Figura 6.2).

Tabla 6.1. Índices fisiológicos de *Cyprinus carpio* luego de la inyección de una dosis subletal de PCB y mezcla de COPs en condiciones estándar de laboratorio.

Índices fisiológicos	Co	PCB	Mz 1	Mz 2
Factor de Condición	1,18 ± 0,02 (10)	1,19 ± 0,01 (10)	1,17 ± 0,01 (10)	1,21 ± 0,02 (10)
Índice hepatosomático	2,33 ± 0,08 (10)	2,45 ± 0,09 (10)	2,36 ± 0,13 (10)	2,74 ± 0,14 (10)

Los datos se expresan como media ± ESM, entre paréntesis se indica el número de muestras. Co, peces inyectados con aceite de maíz; PCB, peces inyectados con 10 µg PCB126/kg p.c.; Mz 1, peces inyectados con la mezcla 10 µg PCB126/kg + 10 mg BaP/kg p.c.; Mz 2, peces inyectados con la mezcla 10 µg PCB126/kg + 10 mg E2/kg p.c. Las diferencias estadísticas significativas entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA ($p < 0,05$) y comparaciones múltiples Prueba de Tukey.

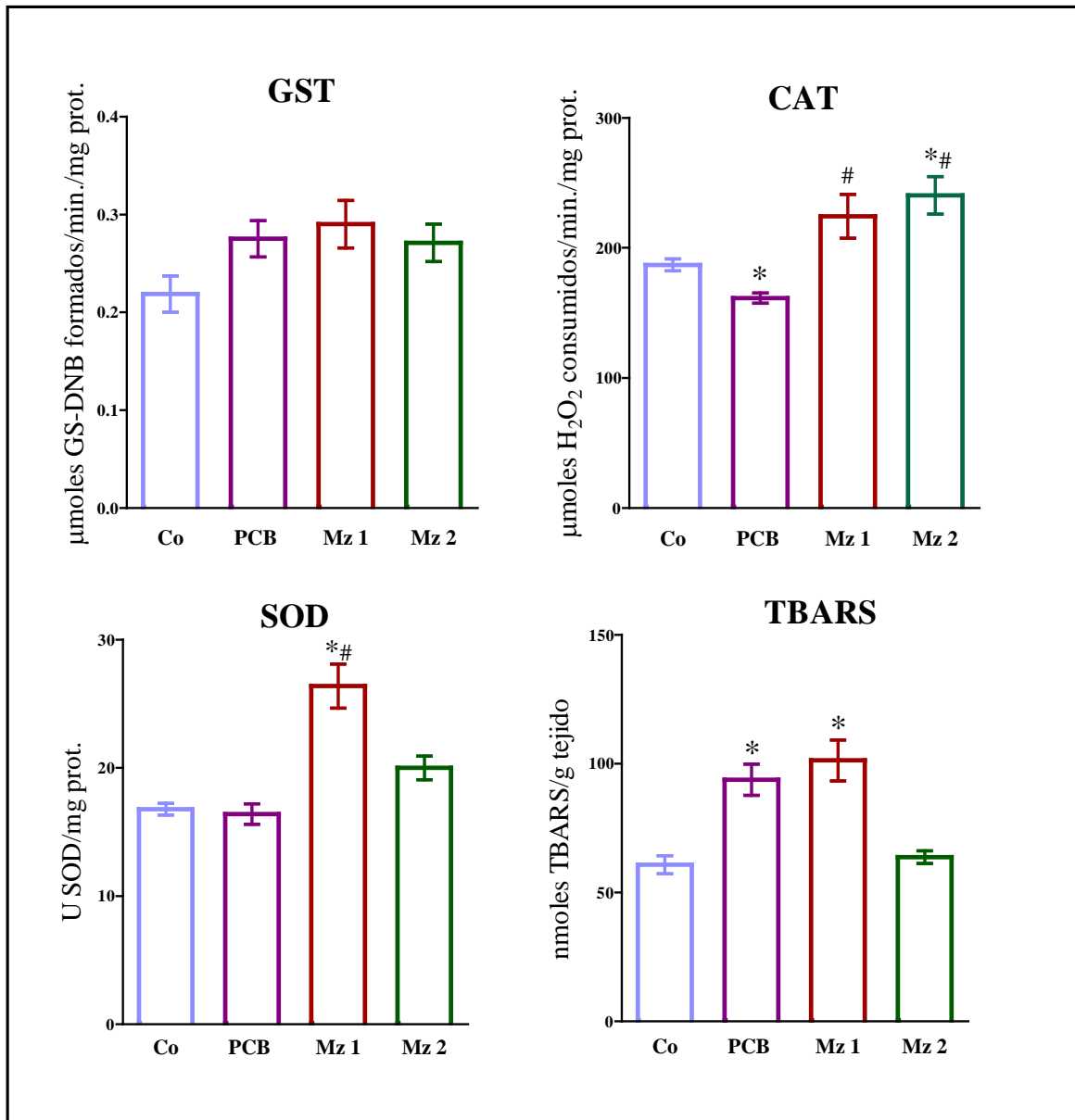


Figura 6.2. Biomarcadores bioquímicos de *C. carpio* evaluados luego de una dosis subletal de PCB 126 y mezclas de COPs bajo condiciones estándar de laboratorio. **Co**, peces inyectados con aceite de maíz. **PCB**, peces inyectados con 10 µg PCB126/kg p.c.; **Mz 1**, peces inyectados con la mezcla 10 µg PCB126/kg + 10 mg BaP/kg p.c.; **Mz 2**, peces inyectados con la mezcla 10 µg PCB126/kg + 10 mg E2/kg p.c. Los datos se expresan como media ± ESM; $n=10$ para cada grupo. Las diferencias estadísticas significativas entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA ($p < 0,05$) y comparaciones múltiples Prueba de Tukey. (*) Indica diferencias significativas respecto al control; (#) Indica diferencias significativas respecto al PCB126.

En la Figura 6.3 se observan los resultados del *Western blot* de la expresión de la proteína CYP1A de *C. carpio* luego de la administración de diferentes COPs y mezclas por medio de una inyección intraperitoneal. Se detectó una banda del tamaño esperado (55 kDa) correspondiente a la CYP1A en los peces inyectados con BaP y BNF, este último utilizado como control positivo y en aquellos inyectados con la mezcla PCB+BaP (Mz1). Sin embargo, no se observó la presencia de banda reactiva en las carpas inyectadas con el PCB126 ni con la mezcla PCB+E2, así mismo no se detectaron bandas en los peces inyectados con aceite de maíz (control negativo).

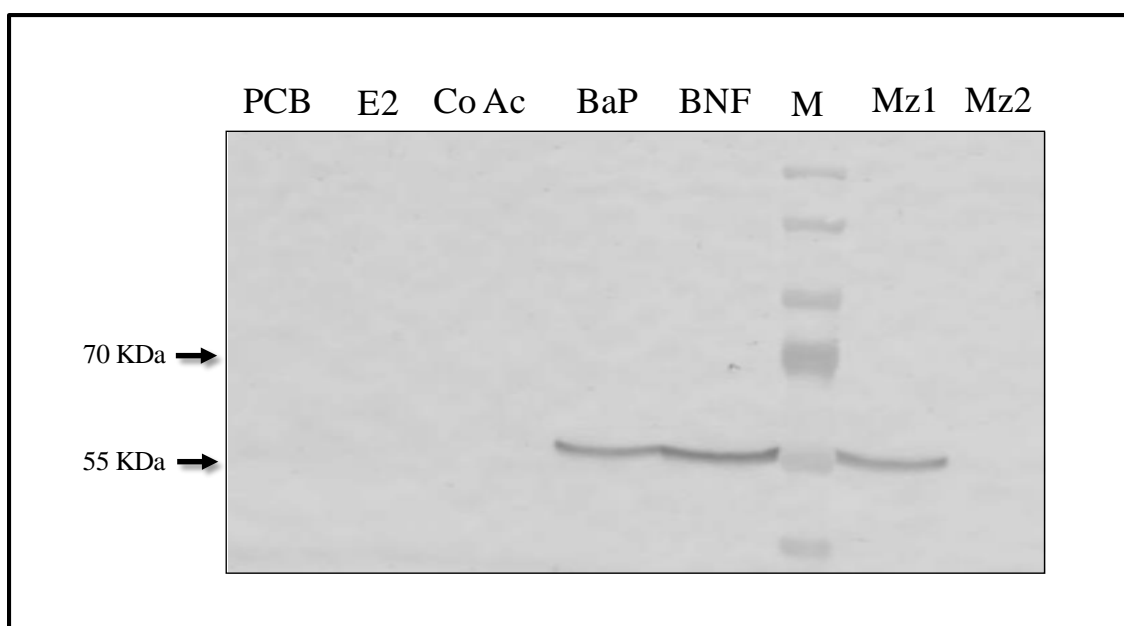


Figura 6.3. Inmunodetección por *Western blot* de la expresión de la proteína CYP1A de *C. carpio* 48h después de la administración de diferentes COPs y mezclas por medio de una única inyección intraperitoneal. Muestras de la fracción FS: **PCB**, bifenilo policlorado 126; **E2**, 17 β -estradiol; **BaP**, benzo(a)pireno; **BNF**, control positivo de β -naftoflavona (50 mg/kg); **Mz1**, mezcla de PCB126 y BaP; **Mz2**, mezcla de PCB126 y E2; **Co Ac**, control negativo de aceite de maíz; **M**, marcador de peso molecular (*Page Ruler*TM. *Prestained Protein Ladder*, Fermentas).

6.3.2 Exposición a sedimentos fortificados con mezclas de PCBs

Luego de 21 días de exposición a sedimento fortificado con una mezcla comercial de bifenilos policlorados, Aroclor[®] 1254:1260, no se observaron diferencias significativas en los índices fisiológicos de ninguna de las especies prueba (Tabla 6.2). Por su parte, en la Figura

6.4 se observan las respuestas de los parámetros bioquímicos evaluados en *C. carpio* y la especie nativa *C. paleatus*. No se observaron cambios en la actividad enzimática de GST en ninguna de las dos especies, sin embargo las enzimas antioxidantes evidenciaron una respuesta diferencial. Se puede observar un incremento significativo tanto en la actividad de CAT (32%) como de SOD (25%) en las *Corydoras* expuestas a la mezcla de Aroclor, mientras que no se vieron modificadas las respuestas de estas enzimas en *C. carpio* respecto a la exposición al sedimento de referencia. Sin embargo, en ambas especies se observó daño oxidativo a nivel de lípidos, evidenciado por el incremento significativo en los niveles de TBARS en *C. carpio* (60%) y *C. paleatus* (82%) expuestos a sedimento fortificado con la mezcla de Aroclor. Respecto a la inmunodetección de la proteína CYP1A, no se detectaron bandas reactivas en ninguna de las dos especies luego de la exposición de los peces a sedimento fortificado con la mezcla de Aroclor, sin embargo en la muestra de uno de los ejemplares de *C. carpio* se observó una banda muy tenue del peso molecular esperado (Figura 6.5). Sin embargo, el anticuerpo anti-CYP 1Ar reconoció una banda proteica en el rango de peso molecular apropiado para la CYP1A de peces (55-65 kDa) tanto en los ejemplares de *C. carpio* y *C. paleatus* inyectados con BNF (control positivo).

Tabla 6.2. Índices fisiológicos de *Cyprinus carpio* y *Corydoras paleatus* luego de 21 días de exposición a sedimento fortificado con Aroclor (1254:1260) en condiciones estándar de laboratorio.

Índices fisiológicos	<i>Cyprinus carpio</i>		<i>Corydoras paleatus</i>	
	S. Co	S. Ar	S. Co	S. Ar
Factor de Condición	1,16 ± 0,04 (10)	1,11 ± 0,03 (10)	1,54 ± 0,04 (12)	1,57 ± 0,03 (11)
Índice hepatosomático	1,82 ± 0,06 (10)	1,88 ± 0,07 (10)	0,69 ± 0,09 (12)	0,86 ± 0,11 (11)

Los datos se expresan como media ± ESM, entre paréntesis se indica el número de muestras. **S. Co**, peces en acuario con sedimento control proveniente del arroyo Las Flores; **S. Ar**, peces en acuario con sedimento fortificado con Aroclor (1254:1260). Las diferencias estadísticas entre los grupos S. Co y S. Ar se evaluaron mediante el *test t* de Student ($p < 0,05$) para cada especie.

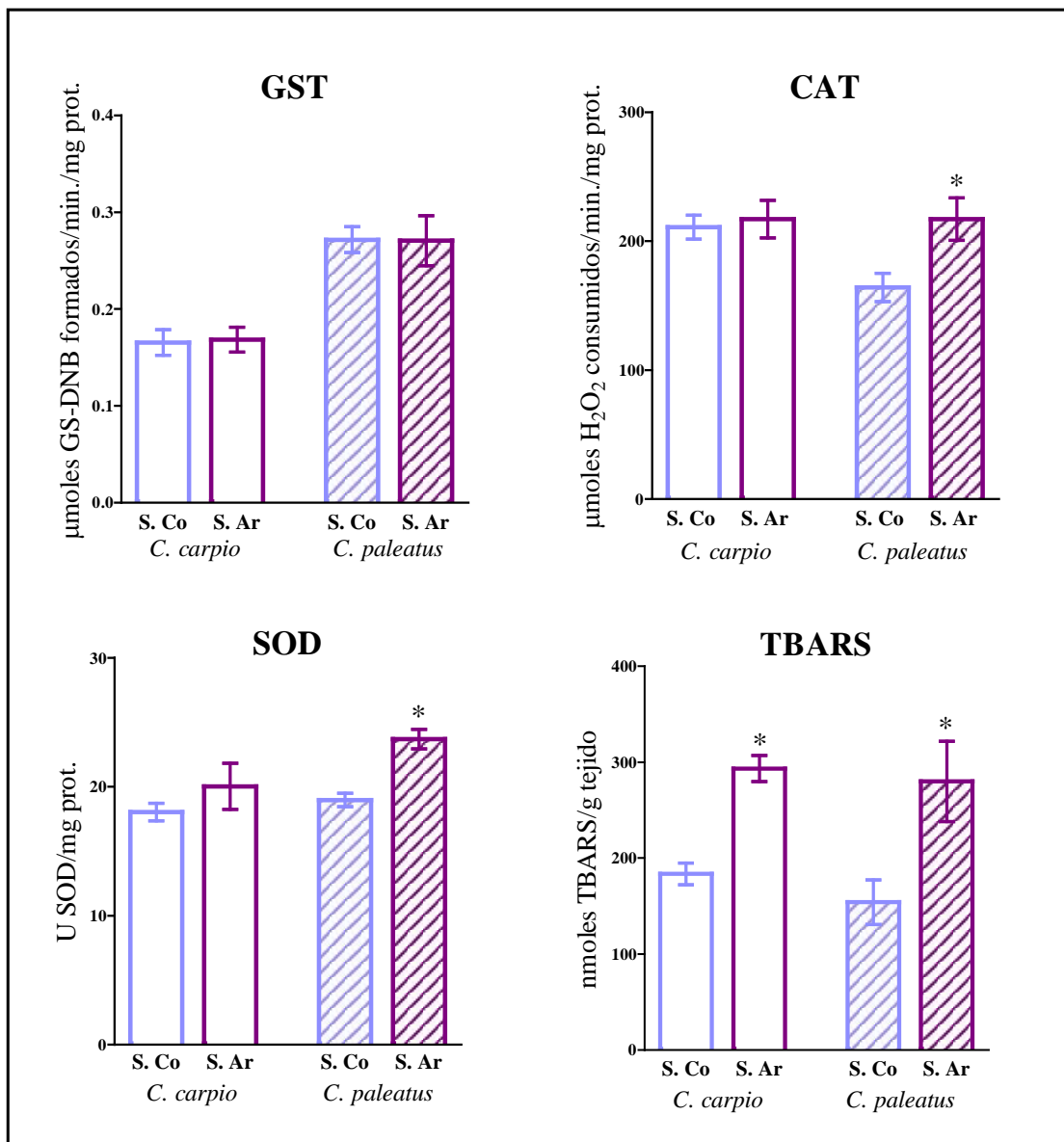


Figura 6.4. Biomarcadores bioquímicos de *C. carpio* y *C. paleatus* evaluados luego de la exposición a sedimento fortificado con Aroclor (1254:1260) bajo condiciones estándar de laboratorio. **S. Co**, peces en acuario con sedimento control proveniente del arroyo Las Flores; **S. Ar**, peces en acuario con sedimento fortificado con Aroclor (1254:1260). Los datos se expresan como media \pm ESM; $n=10$ para cada grupo. Las diferencias estadísticas entre los grupos S. Co y S. Ar se evaluaron mediante el *test t* de Student ($p < 0,05$) para cada especie. (*) Indica diferencias significativas respecto al control respectivo.

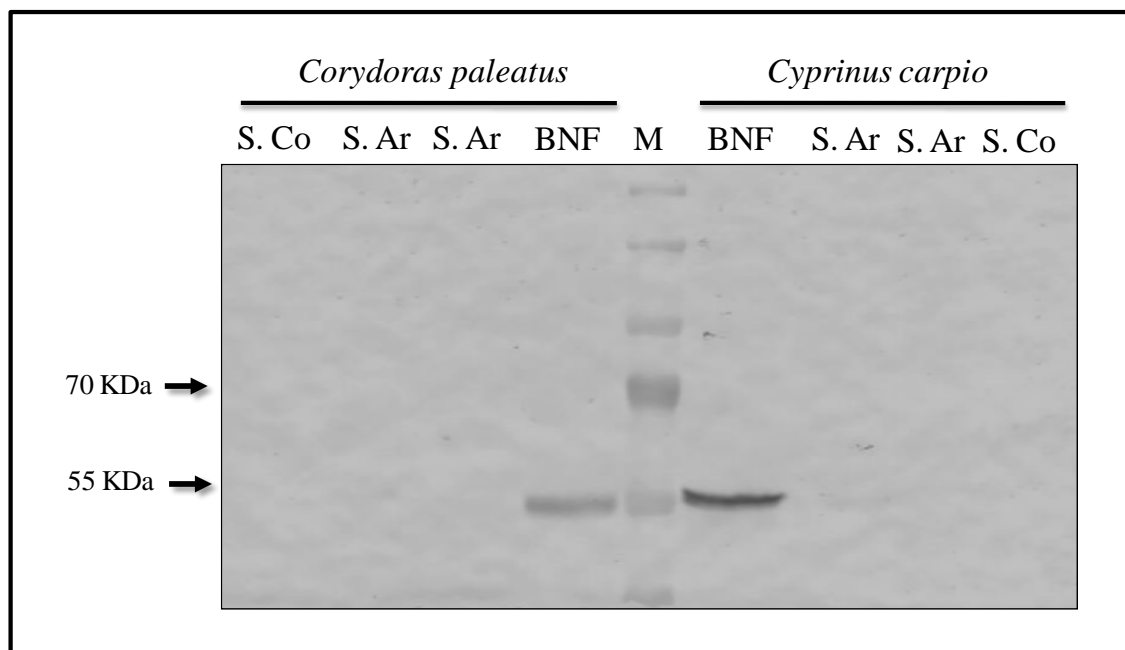


Figura 6.5. Inmunodetección por *Western blot* de la expresión de la proteína CYP1A de *C. carpio* y la especie nativa *C. paleatus* luego de 21 días de exposición a sedimento fortificado con Aroclor 1254:1260. Muestras de la fracción FS de peces expuestos a sedimento control del A° Las Flores (**S.Co**); sedimento fortificado con Aroclor (**S.Ar**); inyectados con 50 mg β -naftoflavona /Kg p.c. como control positivo (**BNF**); **M**, marcador de peso molecular (*Page Ruler*TM. *Prestained Protein Ladder*, Fermentas).

6.3.3 Parámetros fisicoquímicos y determinación de PCBs en sedimento

En la Tabla 6.3 se presenta la caracterización de PCBs del sedimento del A° Las Flores utilizado en los ensayos tipo *spiked*, previo a la fortificación del mismo con la mezcla de Aroclor. Se detectó que la mayoría de los congéneres analizados se encuentran por debajo de los límites de detección y la concentración de PCBs totales se encuentran por debajo de los niveles guía de calidad de sedimento para la vida acuática recomendados por Canadá (34 ng/g p.s.) (CCME, 1999-2002).





Tabla 6.3. Caracterización de PCBs del sedimento del A° Las Flores utilizado en los ensayos tipo *spiked* antes y después del fortificado; composición del Aroclor® 1254 y 1260.

# Cl	PCB #	Aroclor 1254 (%)	Aroclor 1260 (%)	A°. LF (ng/g p.s.)	S.Ar inicial C.c (ng/g p.s.)	S.Ar inicial C.p (ng/g p.s.)
3	28+31	0,19+0,28	0,003+0,04	< LD		
3	33	0,16	0,033	(< LD-1,79)		
4	52	5,38	0,24	< LD	20,78	1,55
4	49	1,1	0,01	< LD		
4	44	2,31	0,003	(< LD-0,48)	4,40	2,01
4	74	0,84	0,05	< LD		
4	70	3,49	0,04	(< LD-0,05)		
4	95+66	6,25+1,01	2,45+0,02	< LD	4,95	8,32
5	101	8,02	3,13	< LD	0	9,34
5	99	3,02	0,04	< LD		
5	87	3,99	0,41	< LD		
5	110	9,29	1,33	< LD	13,32	6,20
5	82	1,11	--	< LD		
6	151	0,69	3,04	< LD		
5+6	123+149	0,15+3,65	---+8,75	< LD	12,68	15,99
5	118	7,35	0,48	< LD	2,19	4,66
6	153	3,77	9,39	(< LD-1,51)	12,36	16,91
5+6	105+132	2,99+2,29	0,22+2,9	(< LD-0,26)		
6	138	5,8	6,54	(< LD-0,29)	10,73	16,03
7	187	0,25	5,4	< LD	5,13	5,18
7	183	0,18	2,41	< LD		
6	128	1,4	0,53	< LD		
7	177	0,2	2,57	< LD		
7	171	0,14	1,11	< LD		
6	156	0,82	0,52	< LD		
7	180	0,67	11,38	< LD	8,04	12,30
7	191	--	0,17	< LD		
6	169	--	--	< LD		
7	170	0,52	4,11	< LD	4,34	6,96
8	199	0,01	1,78	< LD		
8	195+208	---+0,01	0,84+0,13	< LD		
8	194	0,01	2,07	< LD		
ΣPCBs ng/g p.s				(< LD-4,38) ¹	98,92	105,46

#Cl: cantidad de átomos de cloro, PCB#: número de los congéneres analizados, A°LF: sedimento del arroyo Las Flores utilizado en los ensayos tipo *spiked* (los datos se expresan como rango, $n=3$), S.Ar inicial C.c y C.p: sedimento fortificado con Aroclor a tiempo inicial previo al comienzo de los ensayos con *C. carpio* y *C. paleatus* respectivamente. En **negrita** se indican los congéneres más representados en el Aroclor 1254 y 1260 los cuales se tuvieron en cuenta para las determinaciones del ensayo y se consideran en la sumatoria de PCBs (ΣPCBs). ¹se consideran en ΣPCBs todos los congéneres determinados en el sedimento A°LF.

Los parámetros fisicoquímicos del agua evaluados durante el ensayo con sedimento fortificado con la mezcla de Aroclor 1254:1260 se presentan en la Tabla 6.4. Los parámetros evaluados con los electrodos como el OD, pH y conductividad presentan valores similares entre los acuarios con sedimento control (S. Co) y sedimento fortificado con Aroclor (S. Ar 1) así como en relación al acuario que no contuvo peces durante el período experimental (S. Ar 2), esto se observó para ambas especies prueba. Respecto a los parámetros determinados en laboratorio los niveles de NH_4^+ y NO_2^- presentan valores similares entre los acuarios con S. Co y S. Ar1 para ambas especies, sin embargo en ambos casos los niveles de estos parámetros son menores en los acuarios sin peces. Por último, los niveles de MPS y MOP han sido más elevados en los acuarios S. Ar1 respecto a los respectivos controles, mientras que los acuarios que no contuvieron peces (S. Ar2) presentaron una marcada disminución en los niveles de estos parámetros respecto a los acuarios con ejemplares de ambas especies prueba. Este patrón se acentúa en los acuarios del ensayo de *C. carpio* pudiendo inferir que esta especie presentó una mayor movilidad respecto a *C. paleatus*.





Tabla 6.4. Parámetros fisicoquímicos del agua de los acuarios de ensayos de exposición con sedimento fortificado con Aroclor 1254:1260

Parámetros	<i>Cyprinus carpio</i>			<i>Corydoras paleatus</i>		
	S. Co 	S. Ar 1 	S. Ar 2	S. Co 	S. Ar 1 	S. Ar 2
OD (mg/L)	6,1± 0,8	6,7± 0,4	8,1±0,6	8,0 ±0,2	7,6 ±0,3	8,0 ±0,3
pH	8,4 ± 0,1	8,5± 0,1	8,8± 0,1	8,6 ±0,1	8,6 ±0,1	8,7 ±0,1
Conductividad (μS/cm)	1076±21	1101± 22	1098± 22	1076± 41	1069± 63	996 ±15
NH_4^+ (mg/L)	3,4± 2,9	3,4±2,1	1,2± 0,5	0,7 ±0,4	0,7 ±0,3	0,2 ±0,1
NO_2^- (mg/L)	0,8±0,5	0,5±0,1	0,5± 0,3	0,4 ±0,2	0,8 ±0,6	0,3 ±0,1
MPS (mg/L)	347± 175	787± 10	26 ±10	121 ±16	422 ±48	87
MOP (mg/L)	46 ± 21	96 ±8	9±2	25±13	52 ±6	13

Los datos se expresan como media ± ESM, $n=3$. S. Co, acuarios con sedimento control; S. Ar, acuarios con sedimento fortificado con Aroclor (1254:126); S. Ar 1 y S. Ar 2: acuarios con y sin peces respectivamente.

En la Tabla 6.3 se presentan las concentraciones efectivas de los congéneres más representados en la mezcla Aroclor 1254:1260, así como la sumatoria de los mismos (Σ PCBs), las cuales han sido determinadas en el sedimento fortificado inicial previo al comienzo de cada uno de los ensayos. No hubo una disminución en la concentración de PCBs en el sedimento inicial durante el tiempo de almacenamiento, indicando que en ambos ensayos se partió de la misma concentración efectiva. Por su parte, las concentraciones medias efectivas de la Σ PCBs determinadas en los diferentes sistemas experimentales durante cada uno de los ensayos se indican en la Tabla 6.5. Las concentraciones en el sedimento fueron mayores durante el ensayo de *C. paleatus*, las cuales a su vez fueron similares a la concentración del sedimento inicial. En cambio en el ensayo de *C. carpio* se observó una disminución en la concentración de PCBs durante el ensayo respecto al sedimento inicial. Así mismo los valores en el S. Co fueron menores a los niveles guía en ambos ensayos, aunque la Σ PCBs en S. Co de *C. paleatus* fue superior al de *C. carpio*. Sin embargo esto no se vio reflejado en la concentración de PCBs adsorbidos en el MPS ya que la cantidad de PCBs detectada en el acuario control de *C. paleatus* es menor que la cantidad detectada en el acuario control de *C. carpio*. Respecto a los acuarios con S. Ar en ambos ensayos la concentración de PCBs en los acuarios S. Ar1 fue similar a la de S. Ar2, sin evidenciar un efecto aparente de la presencia de los peces en la dinámica del tóxico. Sin embargo, se evidenció una mayor concentración y masa de PCBs en el MPS del acuario S. Ar1 de *C. carpio*, que podría estar relacionado con una mayor movilidad de esta especie que también se ve reflejado en la mayor concentración de MPS (Tabla 6.4). Así mismo, esto podría estar relacionado con la menor concentración de PCBs en el sedimento fortificado de los acuarios de *C. carpio* interpretando que éstos pasaron a estar más disponibles en el MPS que en el sedimento. Por último, la relación de PCBs presentes en el sedimento respecto al MPS fue mayor en el sistema experimental de *C. paleatus* respecto al de *C. carpio*, indicando que en este último los PCBs se distribuyeron mas en el MPS en relación al sedimento.

Tabla 6.5. Concentraciones medias efectivas y cantidad de PCBs totales presentes en los distintos sistemas experimentales.

PCBs totales	<i>C. carpio</i>			<i>C. paleatus</i>		
	S. Co 	S. Ar 1 	S. Ar 2	S. Co 	S. Ar 1 	S. Ar 2
Sedimento (ng/g p.s)	5,3±0,8	51,9 ±4,8	53,0±4,1	17,4±2,5	81,1±4,5	101,8±18,9
MPS (ng/g p.s)	39,9±1,5	1055±725	952±6,7	58,4±0,9	680,9±397,4	900,1±51,8
PCBs en MPS ^(*) (µg/sist. experim.)	0,55	33,21	0,50	0,32	11,49	3,13
Relación de PCBs (sedimento/MPS)	38,1	6,3	214,1	218,0	28,2	130,0

Los datos de concentraciones efectivas se expresan como media \pm ESM, $n=3$. (*) valores calculados a partir de las concentraciones medias de PCBs totales (Σ PCBs) en MPS y los valores medios de MPS presentes en los sistemas experimentales.

6.4 Discusión

En el presente capítulo se evaluó el efecto de la exposición a PCBs y mezclas de COPs sobre las respuestas de biomarcadores hepáticos en *C. carpio* y *C. paleatus*. Estas exposiciones fueron de tipo aguda, por medio de una inyección intraperitoneal y más prolongada en el tiempo mediante sedimento fortificado con una mezcla comercial de PCBs, Aroclor (1254:1260) que se encuentra presente en el ambiente acuático.

Los índices fisiológicos no evidenciaron cambios respecto al control ni en las carpas inyectadas con PCB126 y mezclas de COPs ni en los ejemplares expuestos a sedimento fortificado con la mezcla de Aroclor en ninguna de las especies prueba. Estos resultados coinciden con otros trabajos donde tanto la inyección intraperitoneal de la misma dosis de PCB126 a ejemplares de *Stenotomus chrysops* como la exposición a sedimento fortificado con mezclas comerciales de PCBs (Aroclor[®] 1242, 1254, 1260) de *Limanda limanda* no mostraron variaciones en el IHS ni en el FC (Schlezinger y Stegman, 2001; Hutchinson y col., 2003). Al mismo tiempo, los períodos de exposición en estos trabajos abarcan tiempos cortos

(3 días) así como más prolongados (18 días) los cuales pueden ser comparables con los períodos utilizados en este trabajo.

Se sabe que en los peces, los PCBs actúan a nivel de procesos de biotransformación y son potentes inductores de complejos enzimáticos tales como el sistema de monooxigenasas del citocromo P450 1A y el sistema de enzimas de conjugación de fase II (ej. GST) (Koponen y col., 2000). En relación a los mecanismos de la fase I catalizados por el sistema de monooxigenasas del citocromo P450, diversos autores han reportado la inducción de la expresión de la proteína CYP1A (Huuskonen y col., 1996; Straus y col., 2000; Schlezinger y Stegeman, 2001) así como la actividad catalítica de la EROD (Palace y col., 1996; Koponen y col., 2000; Straus y col., 2000; van Schanke y col., 2000; Arukwe y col., 2001) luego de la exposición de diferentes especies de peces a PCBs coplanares y mezclas comerciales. En particular, en *Cyprinus carpio* la exposición a Aroclor 1254 y congéneres mono-orto sustituidos provocó un aumento en la actividad catalítica de la CYP1A (EROD) (Whyte y col., 2000). Sin embargo en el presente trabajo no se evidenció una marcada inducción en la expresión de la proteína CYP1A de *C. carpio* luego de la inyección intraperitoneal con el PCB126, ni luego de la exposición a sedimento fortificado con la mezcla de PCBs (Aroclor 1254:1260) aunque en uno de los ejemplares se pudo apreciar una tenue banda reactiva correspondiente a la inmunodetección de esta proteína. Del mismo modo tampoco se evidenció una inducción de la CYP1A en *C. paleatus* luego de la exposición al sedimento fortificado con la misma mezcla. Algunos autores han reportado que ciertos congéneres coplanares de PCBs (3,3',4,4'-tetraclorobifenilo PCB77; 3,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenilo PCB169; PCB126) en altas concentraciones también tienen la capacidad de inhibir el sistema del citocromo P450 1A (CYP1A) en algunas especies de peces tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* (White y col., 1997; Schlezinger y col., 1999, 2006; Schlezinger y Stegeman, 2001). Estos cambios a nivel molecular están vinculados con el desacoplamiento y la inactivación de la CYP1A los cuales ocurren a nivel post-transcripcional, por lo tanto puede observarse una inducción hepática de la expresión del ARNm de CYP1A y una mínima inducción o inhibición de la expresión de la proteína y/o su actividad catalítica (EROD) (White y col., 1997; Schlezinger y Stegeman, 2001). Los resultados obtenidos con estos congéneres son consistentes con el hecho de que favorecen el desacoplamiento del ciclo catalítico de la CYP1A con la consecuente formación de EROs, las cuales pueden migrar hacia el medio subcelular o permanecer en el sitio activo produciendo una inactivación oxidativa en la

enzima. Por lo tanto, los congéneres no-*otro* sustituidos que son los más tóxicos y más potentes agonistas del receptor Ahr también estimulan más fuertemente la liberación de EROs inhibiendo e inactivando la CYP1A (Schlezingler y col., 2006). Si bien en el presente trabajo no fue objeto de estudio los mecanismos de activación o inhibición de la CYP1A, esta última podría ser una explicación de la ausencia de inducción de la CYP1A por medio de la inmunodetección de esta proteína. Al mismo tiempo, esta explicación podría ser confirmada por el daño oxidativo a nivel de lípidos evidenciado en ambas especies y ambas formas de exposición, cuyos resultados se discuten más adelante.

Respecto a los procesos de biotransformación de fase II, sistemas enzimáticos como el de la GST facilitan la conjugación de este tipo de compuestos con grupos electrofílicos con el fin de hacer estos xenobióticos más hidrofílicos para su transporte y excreción. En nuestros ensayos, no se observaron modificaciones a este nivel ya que la actividad enzimática de GST no evidenció cambios en los ejemplares de *C. carpio* inyectados con el PCB126 ni en los expuestos al sedimento fortificado con Aroclor respecto a los ejemplares control, esto último también fue observado para *C. paleatus*. Al igual que nuestros resultados de exposición aguda, Huuskonen y col. (1996) no encontraron una clara relación entre la exposición al PCB126 y la actividad enzimática de GST de *Oncorhynchus mykiss* aunque un incremento de esta enzima fue detectado en el hígado de la misma especie luego de la inyección del PCB77 (PCB coplanar tetraclorado). Asimismo, la actividad de GST no fue alterada en lenguados luego de 8 días de la administración de una inyección de la misma dosis del PCB126 (van Schanke y col., 2000). Sin embargo, esta vía de transformación para este tipo de compuestos ha sido reportada en *C. carpio* observando un incremento en la actividad de la GST luego de 21 días de exposición a la mezcla comercial Aroclor 1254 en agua (Schmidt y col., 2005).

La generación de radicales libres durante los procesos de biotransformación promueve la inducción de mecanismos enzimáticos de defensa celular contra el daño oxidativo entre los que se encuentra la actividad de la SOD y CAT. En el presente trabajo las enzimas antioxidantes evidenciaron una respuesta diferencial en *C. carpio* frente a la exposición al PCB 126, se observó una disminución en la actividad de la CAT mientras que la SOD no manifestó cambios. Por su parte, la exposición prolongada al sedimento fortificado con Aroclor mostró una respuesta de las enzimas antioxidantes especie específica, ya que no se observaron cambios en ninguna de las enzimas antioxidantes en *C. carpio*, mientras que *C.*

paleatus evidenció un incremento tanto en CAT como en SOD. A pesar de esta respuesta diferencial en la actividad antioxidante de ambas especies, se detectó un importante daño oxidativo a nivel de lípidos evidenciado por el incremento en los niveles de TBARS en ambas especies y en ambos tipos de exposición. Resultados similares fueron reportados por Palace y col. (1996) en truchas expuestas por medio de inyección intraperitoneal al PCB 126, quienes no observaron cambios en ninguna de las enzimas antioxidantes evaluadas (SOD, CAT y glutatión peroxidasa) y los niveles de TBARS se vieron incrementados. Al mismo tiempo, Vega-López y col. (2007) detectaron inhibición en la actividad de la SOD y un aumento en la CAT acompañado del incremento en los niveles de TBARS luego de la exposición de ejemplares de *Girardinichthys viviparus* a concentraciones subletales de una mezcla comercial de PCB en el agua.

Finalmente, los niveles de PCBs a los que permanecieron expuestos los ejemplares de ambas especies prueba durante los ensayos con sedimento fortificado con Aroclor 1254:1260 fueron superiores a los niveles guía de calidad de sedimentos para la protección de la biota acuática sugerido por la Agencia de Protección Ambiental de Canadá (34 ng/g; CCME, 1999-2002). Estos niveles se encuentran en el rango de niveles reportados por diversos autores en ambientes contaminados (Hutchinson y col., 2003; Vane y col., 2007; Burgess y col., 2009) y en particular en el estuario del Río de la Plata (Colombo y col., 2005a; Scarcia y col., 2012a ver Capítulo 7). Por su parte, en el ensayo de *C. carpio* se evidenció una menor concentración de PCBs durante el ensayo respecto a la concentración del sedimento inicial. Al mismo tiempo, se detectó una mayor concentración y cantidad de PCBs en el MPS en el acuario con ejemplares de *C. carpio*. Si bien esto podría estar vinculado con la mayor movilidad de este organismo prueba en presencia del tóxico, también podría asociarse con un eventual aumento de la disponibilidad de los PCBs en el MPS promovido desde sedimento fortificado; esto último también estaría evidenciado en la baja relación (sedimento/MPS; Tabla 6.5). Sin embargo, la concentración de PCBs detectada en el acuario sin peces también fue menor que en el sedimento inicial, pudiendo inferir que la presencia de los peces no influyó en la concentración del tóxico. Otra explicación posible podría estar relacionada con la concentración de los congéneres individuales analizados en el sedimento inicial y durante el ensayo. Se puede observar que el sedimento inicial utilizado en el ensayo de *C. carpio* presenta una alta concentración de ciertos congéneres con menor número de átomos de Cl y con una configuración no plana de los mismos (ej. PCB 52, 44), los cuales presentan una

menor capacidad de adsorción al sedimento (Tabla 6.3). Al mismo tiempo, en el sedimento analizado durante el ensayo se observó en particular una disminución en la concentración de estos mismos congéneres (información no detallada en Tabla 6.5), de esta forma se podría explicar la disminución en la concentración de PCBs en el sedimento del ensayo de *C. carpio*. Por último, ambas explicaciones podrían estar relacionadas con una menor incorporación del tóxico por los ejemplares de *C. carpio* desde el sedimento y finalmente asociado a la menor respuesta biológica a nivel hepático observada en los niveles de los biomarcadores evaluados respecto a la respuesta evidenciada por la especie nativa. Por el contrario, en el ensayo de *C. paleatus* las concentraciones de PCBs en el sedimento fueron similares a la concentración del sedimento inicial y tampoco se evidenciaron diferencias con el acuario sin ejemplares pudiendo inferir que la presencia de los peces no fue determinante de los niveles del tóxico en sedimento. Cabe mencionar que los niveles de PCBs en el S. Co fueron mayores que los determinados en el S. Co del ensayo de *C. carpio*. Sin embargo esto no se vio reflejado en la concentración de PCBs adsorbidos en el MPS ya que la cantidad de PCBs detectada en el acuario control de *C. paleatus* es menor que la cantidad detectada en el acuario control de *C. carpio*. Así mismo, los niveles de PCBs en el S. Co se encuentran por debajo tanto de los niveles guía (CCME, 1999-2002) como del menor valor que se considera que raramente pueda producir efectos biológicos adversos (22,7 ng/g; Colombo y col., 2005a).

Como se mencionó anteriormente pueden darse distintos tipos de interacciones entre los poluentes presentes en el ambiente, donde puede verse alterada la toxicidad de los mismos así como las respuestas de los biomarcadores en los organismos allí presentes. Durante el presente trabajo se evaluó el efecto adverso producido por la interacción del PCB126 con un HAPs que puede estar presente en el ambiente y un desorganizador endocrino en *C. carpio*. Por lo tanto estos tóxicos fueron administrados por medio de una inyección intraperitoneal de la mezcla del PCB126 + BaP (Mz 1) y del PCB126 + E2 (Mz 2). En relación a los mecanismos de biotransformación de fase I analizados, la exposición a las mezclas de estos compuestos evidenció en la respuesta de la CYP1A una interacción diferencial entre los compuestos de Mz 1 y Mz 2. En el primer caso la interacción de los tóxicos promovió un ligero efecto de potenciación (en relación al BaP administrado aislado) sobre la expresión de la proteína CYP1A de *C. carpio* aunque fue evidente la ausencia de respuesta cuando el PCB126 se administró aislado. Sin embargo, no se puede afirmar la existencia de algún tipo de interacción entre los compuestos de la Mz 2 frente a la respuesta de la expresión de esta

proteína ya que no se observaron bandas reactivas correspondientes a la CYP1A con ninguno de los compuestos por separado ni con la mezcla. Por su parte, no se detectaron cambios significativos en la respuesta de la GST con ninguna de las dos mezclas comparando las respuestas de los ejemplares control así como de los que recibieron sólo el PCB126. Resultados similares fueron reportados por Gunawickrama y col. (2008) en *Scophthalmus maximus* luego de la co-exposición a corto plazo de BaP con otro congéner coplanar y no-orto sustituido (PCB 77) disueltos en agua. Sin embargo los mismos autores no detectaron un patrón claro de inducción luego de un período prolongado de exposición. Al mismo tiempo, van Schanke y col. (2000) tampoco detectaron cambios en la respuesta de la GST luego de la exposición de una especie de lenguado al PCB126 y BaP en dos concentraciones diferentes. Cabe destacar que la respuesta de la GST luego de la exposición de *C. carpio* tanto a BaP como a E2 tampoco ha evidenciado un cambio en la actividad de esta enzima (ver Capítulos 4 y 5), por lo tanto la interacción de estos compuestos no tuvo efecto a nivel de biotransformación de fase II en esta especie prueba y bajos las condiciones experimentales ensayadas. Respecto a las enzimas antioxidantes se evidenció una respuesta diferencial en ambas mezclas, observándose un incremento en la actividad de la CAT con Mz 2 y en la SOD con Mz 1 en relación a los controles respectivos. Gunawickrama y col. (2008) reportaron una alteración en las actividades enzimáticas de SOD, CAT y glutatión peroxidasa en el hígado de *S. maximus* luego de la exposición conjunta del BaP con PCB77 respecto al control. La actividad de la CAT incrementó significativamente luego de 6 meses de exposición a diferencia de nuestro trabajo donde si bien se observó una tendencia de aumento luego de 48h la misma no fue significativa. El daño oxidativo a nivel de lípidos se evidenció en *C. carpio* luego de la exposición a la mezcla de PCB126 con BaP respecto al control, sin embargo la mezcla de PCB con E2 no tuvo efecto sobre la lipoperoxidación ya que no se modificaron los niveles de TBARS. En este último caso el incremento de la actividad de la enzima antioxidante CAT pudo haber evitado el daño oxidativo, sin embargo el incremento de la SOD no fue suficiente para prevenir este daño luego de la exposición con la mezcla PCB+BaP.

CAPÍTULO 7

**Evaluación de la calidad ambiental de ríos periurbanos mediante
respuestas de parámetros biomarcadores de *Cyprinus carpio* y
especies nativas**

7.1 Introducción

El excesivo desarrollo de las actividades humanas es uno de los principales problemas que contribuyen a aumentar los niveles de contaminantes pudiendo afectar la integridad biológica de los ambientes acuáticos. Durante las últimas décadas el medio acuático ha sufrido el aporte de un creciente número de contaminantes vertidos sistemáticamente en él, entre los que se encuentran los compuestos orgánicos persistentes (COPs). En particular, los ríos periurbanos representan un ejemplo típico de ecosistemas afectados por la actividad antropogénica que se desarrolla en sus márgenes. Los centros urbanos y los industrializados generan una gran variedad de estos contaminantes que alcanzan rápidamente estos ecosistemas ya sea por fuentes puntuales como difusas. En nuestro país existen numerosos casos de este tipo, en el presente capítulo nos centraremos en dos ríos periurbanos: el Río de la Plata y el río Luján.

En el Río de la Plata las numerosas áreas urbanas, industriales y portuarias localizadas a lo largo de la costa Argentina han tenido un impacto negativo sobre este cuerpo de agua. En particular, la localidad de Punta Lara es una zona costera del Río de la Plata perteneciente al partido de Ensenada, que se encuentra entre dos grandes centros urbanos (Buenos Aires y La Plata) que concentran aproximadamente 12 millones de habitantes y es lindante a un sector petroquímico con la mayor refinería de petróleo del país (Colombo y col., 2006). Es una zona balnearia popular al sur del conurbano, en la zona terrestre de este área se encuentra la Reserva Natural Punta Lara que fue declarada en el año 1958 a través del Decreto N° 5.421 como Reserva Natural Integral de Selva Marginal de Punta Lara (FREPLATA, 2003; www.reservapuntalara.com.ar). Por su parte, en este sitio y en zonas cercanas se ha reportado la presencia de diversos contaminantes tales como hidrocarburos alifáticos (HAs), aromáticos policíclicos (HAPs), bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas, benzofuranos y metales pesados asociados principalmente al sedimento y al material particulado en suspensión (Colombo y col., 2005a, b; 2006). La composición química de las mezclas de hidrocarburos que se encuentran en sedimentos refleja las contribuciones relativas de diversas fuentes naturales y antrópicas de origen biogénico, diagénético, petrogénico, y pirogénico. En zonas altamente pobladas e industrializadas predominan los aportes antropogénicos, mientras que en áreas remotas la mayoría de los hidrocarburos tienen principalmente un origen natural. Al mismo tiempo, esto se ve reflejado en la biota allí presente principalmente en bivalvos y peces (Bilos

y col., 1998; Colombo y col., 2000; 2007; 2011; Aizpun de Moreno y col., 2004). En la Franja Costera Sur, altos niveles de residuos de PCBs, plaguicidas organoclorados, e hidrocarburos alifáticos han sido reportados principalmente en tejido de sábalos (*Prochilodus lineatus*) especie detritívora, de elevado contenido graso y gran valor comercial, por lo que representan un serio riesgo para la salud humana (Colombo y col. 2000; 2011). Al mismo tiempo, ejemplares de *C. carpio* de la zona de Punta Lara, muestran señales de PCBs recientes (“frescas”), con niveles comparables con los del sábalo (Colombo y col, 2000). La composición de hidrocarburos detectados en estas especies reflejan los patrones evidenciados en el ambiente indicando la prevalencia de residuos petrogénicos en sábalos y carpas especialmente en aquellos recolectados de las zonas de Quilmes y Punta Lara (Colombo y col., 2000). También se ha detectado la presencia de altas concentraciones de dioxinas y furanos en invertebrados (*Corbicula fluminea*) recolectados en la Franja Costera Sur del Río de la Plata (Colombo y col., 1995, 1997; Cataldo y col. 2001; Barra y col., 2002). El aumento de las descargas de PCBs al Río de la Plata, entre los años 2001 y 2002, se vio reflejado en un incremento considerable (de 3,6 a 9 $\mu\text{g/g}$) en los niveles de PCBs observados en los sábalos (Colombo y col., 2007). Para sábalos capturados a lo largo de 1.500 km del Río Paraná y el Río de la Plata, entre Ituzaingó (Norte de la Provincia de Corrientes) y Magdalena (al Sur de La Plata), se ha observado una distribución espacial consistente entre los sábalos más contaminados y aquellos puntos de mayor desarrollo urbano e industrial y una disminución de PCBs en la parte alta del río Paraná. Esta distribución espacial fue coincidente con la presencia de estos compuestos en los sedimentos y la bioacumulación en almejas asiáticas (*Corbicula fluminea*) contaminadas con compuestos orgánicos (Barra y col., 2002)

El río Luján es un típico río de llanura de la provincia de Buenos Aires y uno de los más importantes ríos periurbanos del AMBA ya que fluye por zonas con grandes asentamientos de población humana. Es un río afectado por la contaminación cuya calidad del agua ha sido estudiada desde el punto de vista químico y físico como también biológico (Pizarro y Alemanni, 2005). En particular, el tramo medio cruza el partido de Luján (desde Jáuregui hasta la ciudad de Pilar) y recibe diferentes tipos de impacto, siendo los principales aportes puntuales las descargas líquidas urbanas e industriales. Luego de atravesar la ciudad de Luján, se encuentra la planta de tratamiento de efluentes líquidos (PTTEL) municipal, la cual vuelca al río un caudal diario de 11.000 m^3 (Sánchez Caro, 2010). Además, el tramo medio recibe el impacto de varias industrias tales como textiles, lácteas,

curtiembres, alimenticias y celulosas las cuales descargan sus residuos tanto en el sistema cloacal de la ciudad así como directamente en las aguas superficiales (Di Marzio y col., 2005; Sánchez Caro, 2010). Diversos autores han realizado estudios sobre la calidad del agua del río Luján y de sus afluentes, los cuales se basan principalmente en la evaluación de los parámetros de físico-químicos, nutrientes, estructura de la comunidad fitoplanctónica y del perifíton, junto con los datos hidrológicos básicos (Giorgi y col., 1999; 2002; O'Farrell y col., 2002; Pizarro y Alemanni, 2005). A su vez, durante el período 2004-2005 el Instituto Nacional del Agua de Argentina llevó a cabo un estudio de monitoreo fisicoquímico de la calidad de agua y sedimento del río Luján. Este informe muestra que el impacto de la contaminación antropogénica se evidencia en diferentes sitios del río, debido principalmente a un incremento en las concentraciones de metales pesados, contaminantes orgánicos y bacterias coliformes en las aguas superficiales. Además, Di Marzio y col. (2005) realizaron un estudio ecotoxicológico, mediante ensayos de toxicidad aguda con agua y sedimento del río Luján con diferentes organismos prueba. Por su parte, en el laboratorio del Programa de Ecofisiología Aplicada (PRODEA) de la Universidad Nacional de Luján se han realizado diferentes aportes sobre la calidad del agua del río Luján mediante estudios biológicos a nivel comportamental y morfológico en peces expuestos a muestras ambientales en condiciones de laboratorio (Eissa, 2009). Así mismo, se han realizado estudios de evaluación ecotoxicológica utilizando parámetros químicos, bioquímicos, fisiológicos y genotóxicos, en larvas de anuros (*Lithobates catesbeianus*) mediante bioensayos semiestáticos de laboratorio (Ossana, 2011).

En nuestro país los programas de monitoreo se han basado principalmente en la química y bacteriología del agua, con mediciones de las variables principales necesarias para la determinación de ciertos índices de calidad de agua. El enfoque multidisciplinario considerando la evaluación simultánea de una serie de factores y procesos que, en una imagen integradora, pueden determinar sus características, ha sido poco desarrollado o ausente. El uso de la biota para supervisar la calidad de los medios acuáticos ha sido relativamente poco común en comparación con las variables abióticas (Salibián, 2006). La evaluación ecotoxicológica de la contaminación acuática por lo tanto puede ser abordada mediante el estudio de los biomarcadores empleando diferentes metodologías. El uso de biomarcadores en peces puede proveer información muy útil para describir cambios en la calidad del agua (van der Oost y col., 2003). Actualmente una parte importante de las investigaciones en biomarcadores es la evaluación y validación de estas respuestas en estudios a campo (Pandey

y col., 2003; Ozmen y col., 2006; Tejeda-Vera y col., 2007). Muy a menudo estos estudios implican la recolección de peces en ambientes contaminados y sus respuestas biológicas son comparadas con las de ejemplares extraídos de lugares de referencia. En general, estos estudios no contemplan ciertos factores a los que pueden estar sujetos los organismos prueba tales como la migración ya sea por alimentación o reproducción y la movilidad de los individuos como respuesta de evadir determinados sitios frente a la presencia de los contaminantes. En este contexto, la inmersión directa de peces confinados en jaulas en un sitio de interés ofrece un enfoque más realista y permite tener conocimiento preciso sobre el lugar y tiempo de exposición (Oikari, 2006; Almoth y col., 2008a). El uso simultáneo de ambas metodologías, así como el análisis de varios biomarcadores es importante para minimizar posibles interpretaciones erróneas principalmente en situaciones complejas de contaminación (Oikari, 2006; Linde-Arias y col., 2008). Al mismo tiempo, la batería de biomarcadores usados en este estudio permitiría evaluar la exposición e incorporación de los contaminantes presentes en los sitios de estudio, en el hígado de los organismos prueba.

7.1.1 Hipótesis y objetivos

Hipótesis:

Los COPs de origen antrópico presentes en los ríos periurbanos pueden afectar a la biota presente en los cuerpos de agua y promover respuestas diferenciales de los biomarcadores tanto en ejemplares de las especies prueba expuestos *in situ* como en los recolectados en el sitio.

Las respuestas de los biomarcadores de los ejemplares de *C. carpio* luego de su exposición en jaulas en Punta Lara son comparables con las exposiciones en laboratorio al sedimento del mismo sitio.

Objetivos:

1. Estudiar el impacto adverso de la contaminación antrópica en dos ríos periurbanos por medio de una evaluación biológica utilizando como punto final las respuestas de biomarcadores hepáticos de una especie estandarizada (*Cyprinus carpio*) y especies nativas.

2. Evaluar la respuesta de los biomarcadores en las especies prueba mediante ensayos a campo por exposición *in situ* de peces confinados en jaulas y recolección de especies nativas de la zona de estudio.
3. Evaluar y comparar el efecto adverso producido por exposición de ejemplares de *C. carpio* a tóxicos presentes en Punta Lara en condiciones de campo por medio de la exposición *in situ* en jaulas sumergidas y bajo condiciones de laboratorio por medio de muestras ambientales de sedimento.
4. Evaluar y comparar la respuesta de los biomarcadores de una especie nativa en dos tiempos, luego de la exposición *in situ* y analizar una posible respuesta temprana de dichos parámetros.

7.2 Estudios en la zona de Punta Lara (Río de la Plata)

7.2.1 Materiales y Métodos

7.2.1.1 Área de estudio

Los ensayos se llevaron a cabo en el estuario del Río de la Plata, en la zona costera de Punta Lara (34° 46' 59'' S; 58° 00' 35'' W) durante los veranos de 2007 y 2010 (Figura 7.1). Punta Lara es un área lindante a zonas altamente industrializadas del Río de la Plata, localizada en la Provincia de Buenos Aires aguas abajo de la localidad de Quilmes y cercana a la ciudad de La Plata.



Figura 7.1 Imagen satelital de Punta Lara y zonas aledañas. **PL 1** y **PL 2**, puntos donde se llevaron a cabo los ensayos en jaulas durante el 2007 y 2010 respectivamente.

7.2.1.2 Diseño experimental

a- Exposición in situ y recolección de ejemplares en campo

Juveniles de *C. carpio* ($n=20$) con $3,9 \pm 0,5$ g p.c. en 2007 y ($n=22$) con $4,5 \pm 0,2$ g p.c. en 2010 (media \pm ESM) fueron utilizados como organismos prueba estandarizados. Los peces permanecieron por un período de 7 días previo a los ensayos en aclimatación bajo condiciones estandarizadas de laboratorio con fotoperíodo de verano (16:8h D:N) como se describe en la sección 3.2 (ver Figura 3.1). Estos ensayos consistieron en la exposición en jaulas sumergidas de un grupo de carpas a las condiciones ambientales de Punta Lara (sitio experimental, PL) y otro permaneció en la parte superior del arroyo Las Flores (sitio de referencia, SR I). En estos ensayos, los ejemplares de carpa permanecieron durante 21 días confinados en jaulas de similares características que las descritas anteriormente con una densidad de carga de 1-2 g p.c./L, las cuales permanecieron aseguradas y mantenidas por medio de “lastre” a una distancia aproximada de 10 cm del fondo. Tanto en el verano de 2007 como del 2010, los peces del sitio de referencia permanecieron sumergidos en forma contemporánea con los de Punta Lara.

Al mismo tiempo que se realizó la evaluación por medio de jaulas sumergidas con la especie estandarizada, se efectuó en cada año un muestreo en la zona costera de estudio y se seleccionó una especie representativa de la ictiofauna nativa local. De esta forma se recolectaron en el año 2007 ejemplares juveniles de *Leporinus obtusidens* ($n=20$; $13,7 \pm 1,8$ g p.c.; media \pm ESM) y en 2010, juveniles de *Prochilodus lineatus* ($n=21$; $70,9 \pm 4,1$ g p.c.; media \pm ESM), ambas especies nativas con amplia distribución y de gran importancia en el área estudiada. Los ejemplares fueron colectados en el mismo sitio experimental utilizando una red de arrastre como se describe en la sección 3.2.2 b y fueron llevados al laboratorio inmediatamente para su procesado (ver sección 3.3). Los peces nativos utilizados como control se obtuvieron de zonas no poluidas del río Paraná, y con el fin de minimizar el posible estrés del transporte, permanecieron en condiciones controladas de laboratorio durante 7 días previos a su procesado. Las bogas controles se obtuvieron con la ayuda de los pescadores locales de un sitio ubicado en el río Paraná medio, en la provincia de Corrientes ($28^{\circ} 16' 11''$ S; $59^{\circ} 01' 44''$ W; SR III). Este sitio fue elegido debido a la ausencia de zonas de referencia en Buenos Aires, donde se pueda capturar ejemplares juveniles de esta especie nativa. Los sábalos controles fueron colectados de un arroyo afluente del río Paraná, el A° Guayracá,

(34° 20' 58'' S; 58° 39' 54'' W; SR IV) considerado sitio de referencia. Estos ensayos se realizaron en forma contemporánea a la exposición en jaulas de *C. carpio* de cada año de estudio.

Cabe mencionar que aunque ejemplares adultos de *C. carpio* silvestres están normalmente presentes en Punta Lara, durante el ensayo realizado no se pudo coleccionar individuos juveniles de esta especie.

b- Exposición a sedimentos ambientales en condiciones de laboratorio

Se utilizó como organismos prueba a ejemplares juveniles de *C. carpio* ($n=20$; $3,6 \pm 0,1$ g p.c.; media \pm ESM), los cuales permanecieron por un período de 7 días previo a los ensayos en aclimatación bajo condiciones estandarizadas de laboratorio con fotoperíodo de verano (16:8h D:N) como se describe en la sección 3.2.

Se realizaron ensayos con sedimento superficial del Río de la Plata, de la misma zona de Punta Lara y se utilizó como sedimento control el proveniente de la capa superficial del A° Las Flores, sitio de referencia de los ensayos en campo (SR I) (ver sección 3.2.1 *d*). Estos ensayos fueron de tipo estático con aireación constante y un flujo cerrado de agua para una mejor oxigenación del medio. La duración de los mismos fue de 21 días bajo las siguientes condiciones controladas de laboratorio: $22 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura del agua, fotoperíodo 16:8h D:N y una densidad de carga de 1g p.c./L por acuario.

Este ensayo se realizó en forma contemporánea con la exposición *in situ* por medio de jaulas sumergidas con la misma especie prueba (*C. carpio*).

7.2.1.3 Parámetros biomarcadores

En el presente capítulo se determinaron los índices fisiológicos (FC e IHS) tal como fueron descritos en la sección 3.4.1. Se evaluaron los biomarcadores asociados a la biotransformación como la actividad enzimática de GST y la inmunodetección de la proteína CYP1A según han sido descritos en la sección 3.4.2. Por último de los parámetros asociados al estrés oxidativo se evaluó la actividad enzimática de la CAT y SOD así como los niveles de TBARS siguiendo las condiciones ya descritas en la sección 3.4.3.

7.2.1.4 Parámetros fisicoquímicos y caracterización de sedimentos

Se registraron los parámetros fisicoquímicos básicos del agua de los acuarios y de Punta Lara y el arroyo Las Flores a partir de muestras tomadas en al menos dos oportunidades a lo largo del período experimental. Se determinó el pH, la conductividad y el oxígeno disuelto (OD) por medio de electrodos de campo así como la concentración de amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y fósforo reactivo soluble (PRS) mediante las técnicas especificadas en el capítulo 3, sección 3.5.

Se colectaron muestras de agua superficial de ambos sitios en las cuales se determinó el PRS, NH_4^+ , NO_2^- , material particulado en suspensión (MPS) y materia orgánica particulada (MOP). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado siguiendo los procedimientos indicados en APHA (2005). Por su parte en campo se determinó la temperatura del agua, pH, OD y conductividad por medio de electrodos de campo (capítulo 3, sección 3.5).

Se recolectaron muestras de sedimento superficial en Punta Lara (0-2 cm) en las cuales se determinó la presencia de hidrocarburos tanto HAPs como HAs, PCBs totales y en el muestreo de 2007 se determinó también la presencia de metales. Se caracterizó el sedimento determinando materia orgánica y la composición granulométrica (capítulo 3, sección 3.5).

En el ensayo realizado en el 2007, se determinó en el sedimento la presencia de metales (cromo total, cobre, níquel, plomo y zinc) por digestión ácida de las muestras utilizando métodos colorimétricos estandarizados (Hach Corp., Germany). Las fracciones alifáticas y aromáticas se separaron por cromatografía de partición en columna de sílice. Cada fracción se analizó por cromatografía gaseosa de alta resolución en un cromatógrafo Shimadzu. Los componentes fueron identificados por comparación en los tiempos de retención con mezclas de hidrocarburos estándares externos (Supelco) (Colombo y col., 1989; Lavarías y col., 2005). El análisis de los PCBs se realizó por medio de cromatografía gaseosa de alta resolución utilizando columnas capilares DB-5 de 30 m y detector de captura de electrones (HRGC/ μ ECD). La determinación de los compuestos se realizó por comparación de los tiempos de retención con los obtenidos de estándares de PCB (*Accu Standard*); así la cuantificación de los PCBs totales se basó en el análisis de 41 congéneres individuales y soluciones de Aroclor 1242, 1254. Dado que las muestras naturales son muy complejas, para determinar el posible origen antropogénico o biogénico de los hidrocarburos alifáticos

presentes en el sedimento se emplearon algunos índices de distribución de alcanos reportados por Colombo y col. (1989) y Lavarías y col. (2005). El índice de bajo/alto peso molecular de hidrocarburos (BPM/APM), es la tasa de la sumatoria de los n-alcanos $\leq C_{20}$ sobre la sumatoria de los n-alcanos $\geq C_{21}$. El índice del carbono preferido (ICP) está dado por la tasa de $(2(C_{27}+C_{29}))/C_{26}+2C_{28}+C_{30}$ y el índice Alk/Iso dado por la siguiente ecuación ($\sum n-C_{14}-n-C_{18}/\sum$ cinco isoprenoides).

Por su parte en el 2010, el análisis cuali-cuantitativo de los hidrocarburos (HAPs) y compuestos organoclorados (PCBs y pesticidas-POCs-) se realizó en el laboratorio de Microcontaminantes acuáticos de la Universidad Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil (Niencheski y Fillmann, 2006). La extracción y concentración se realizó de la misma manera para todos los analitos analizados. En todos los casos a las muestras de sedimento seco (10-20 g) se le añadieron los patrones internos correspondientes según los compuestos a analizar, se mezclaron con sulfato de sodio anhidro y se extrajeron con 200 ml de n-hexano/diclorometano (1:1) junto con cobre activado (elimina el azufre en forma de precipitado de sulfato de cobre evitando interferencias en el análisis cromatográfico) en un aparato Soxhlet durante 12 h (4 ciclos por hora). Los extractos obtenidos se concentraron en rotavapor a 40-50°C hasta llegar a un volumen de 4-5 ml y fueron almacenados en oscuridad a 10°C hasta el análisis de los mismos. Las fracciones alifáticas y aromáticas se separaron por cromatografía líquida de adsorción en columna de sílice/alumino. Posteriormente la fracción de HAPs se analizó con un cromatógrafo de gases con inyector *split/splitless* equipado con detector de masa (GC/MS). Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu 17 con una columna capilar 5MS-5% difenil dimetilpolisiloxano de 30 m de longitud, 0,25mm de diámetro interno, 0,25 μ m de espesor de fase. Para la fracción de HAPs se utilizó como eluyente diclorometano (10% y 50%) en hexano y helio como gas portador. La determinación cualitativa se realizó a través de algunos iones característicos de estos compuestos y sus respectivos tiempos de retención relativa mediante la inyección de estándares de HAPs. La cuantificación fue realizada por medio de una curva de calibración donde fueron analizados cada uno de los HAPs de interés con los siguientes patrones internos: naftaleno-d8; acenafteno- d10; fenantreno-d10; criseno-d12; perileno-d12. Respecto a los compuestos organoclorados, el fraccionamiento del extracto de los PCBs (F1) y plaguicidas clorados (F2) ha sido obtenido por cromatografía líquida de adsorción en una columna de Florisil[®]. La fracción F1 ha sido eluída con n-hexano mientras que para la fracción F2 se utilizó 20% diclorometano en hexano

como eluyente, posteriormente ambos extractos se evaporaron con la ayuda de un flujo suave de nitrógeno, hasta 1ml. El análisis cuali-cuantitativo de los extractos se realizó por medio de un cromatógrafo de gases con inyector *split/splitless* equipado con un detector de captura de electrones (GC-ECD). Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu equipado con una columna capilar de cromatografía de 60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de fase (con fase de 5% fenil/ 95% metil siloxano). El transporte de los compuestos dentro de la columna capilar se realizó por medio de helio o hidrógeno de alta pureza. Se utilizaron estándares internos y patrones internos cromatográficos para la identificación y cuantificación de los analitos. La identificación se basó en los tiempos de retención relativa, mientras que la cuantificación fue realizada en base a las áreas de los picos obtenidos para cada analito. Los patrones internos cromatográficos utilizados fueron el PCB 209 y el 4,5,6-tetracloro-m-xileno (TCMX) ya que sirven para compensar las fluctuaciones durante el análisis cromatográfico de gases, mientras que los estándares internos han sido el PCB 103, 198 para los PCBs y 4,4'-Dibromooctafluorbifenil (DBFOB) para los pesticidas clorados. Los límites de detección fueron: 0,04 ng/g para los HAPs, 0,05 ng/g para PCBs y 0,1 ng/g para POCs.

Tanto las muestras de agua como las de sedimento fueron mantenidas en botellas de vidrio refrigeradas durante su traslado al laboratorio y permanecieron a -20°C hasta su procesado.

7.2.1.5 Análisis estadístico

Se estudió la normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos por medio del *test* de Kolmogorov-Smirnov y el de Levene. Las comparaciones entre el grupo experimental y el control se evaluaron para cada especie mediante el *test t* de Student ($p < 0,05$). Se realizó un análisis discriminante canónico con el objeto de analizar la existencia de diferencias significativas entre los grupos experimentales de los ensayos realizados con *C. carpio* en campo, *in situ* y con sedimentos ambientales en ambos sitios de estudio, respecto a los parámetros biomarcadores. Este método permite representar gráficamente las posiciones y orientaciones relativas de las respuestas integradas de los peces. Para ello fueron considerados como variables independientes las respuestas de todos los parámetros biomarcadores fisiológicos y bioquímicos (FC, IHS, CAT, SOD, GST, TBARS). En aquellas variables que

no presentaron una distribución normal se utilizó la transformación logarítmica (log10). Las funciones discriminantes se calcularon en forma conjunta mediante el método estándar de estimación simultánea estableciendo las probabilidades de clasificación *a priori* proporcionales al tamaño de los grupos y analizando la redundancia de las variables (tolerancia 0,01). La contribución de las respectivas variables en cada función discriminante se identificó mediante los coeficientes estandarizados.

7.2.2 Resultados

No se observó mortalidad en ninguno de los grupos experimentales durante los períodos de ensayo.

Exposición *in situ* y recolección de ejemplares en campo

Durante el verano de 2007, la exposición *in situ* de *C. carpio* en jaulas sumergidas en Punta Lara promovió un incremento significativo tanto en el FC como en el IHS, siendo este último un aumento más evidente (45%) (Tabla 7.1). Sin embargo, en los ejemplares de *L. obtusidens* recolectados en la zona costera de Punta Lara no se evidenció modificaciones en el IHS, mientras que se observó una disminución significativa (-10%) en el FC (Tabla 7.1).

Tabla 7.1. Índices fisiológicos de *Cyprinus carpio* y *Leporinus obtusidens* luego de la exposición *in situ* y recolección en Punta Lara y sitios de referencia respectivamente (2007).

Índices fisiológicos	<i>Cyprinus carpio</i> (Exposición <i>in situ</i>)		<i>Leporinus obtusidens</i> (Recolección)	
	SR I	PL	SR III	PL
Factor de Condición	0,98 ± 0,03 (10)	1,24 ± 0,03* (10)	1,16 ± 0,03 (10)	1,04 ± 0,04* (10)
Índice hepatosomático	1,57 ± 0,09 (10)	2,28 ± 0,13* (10)	0,94 ± 0,04 (10)	0,95 ± 0,07 (10)

Los datos se expresan como medias ± ESM, entre paréntesis se indica el número de muestras. Las diferencias estadísticas significativas entre los grupos de cada especie se evaluaron mediante *test t* de Student $p < 0,05$; (*) Indica diferencias significativas respecto al sitio de referencia.

En la Figura 7.2 se indican las respuestas de los parámetros biomarcadores bioquímicos de *C. carpio* y *L. obtusidens* luego de la exposición *in situ* y recolección en Punta Lara y los respectivos sitios de referencia (SRI y SRIII). La exposición en jaulas de las carpas en Punta Lara promovió una respuesta significativa de todas las enzimas hepáticas evaluadas. En particular en las enzimas antioxidantes se evidenció un incremento más notorio en la actividad de la CAT siendo el mismo del 51%. Por su parte la GST también demostró un importante aumento del 40% en su actividad en relación a los peces que permanecieron en SRI. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en los niveles de TBARS entre los peces que permanecieron en Punta Lara respecto a los del A° Las Flores. Respecto a los parámetros bioquímicos evaluados en las bogas colectadas en Punta Lara, se evidenció una respuesta antioxidante diferencial, observándose un incremento significativo en la actividad de la SOD (47%) mientras que CAT disminuyó (-24%) en los peces de Punta Lara respecto a los ejemplares del sitio de referencia (SRIII). Al mismo tiempo, se evidenció un importante incremento en la peroxidación de los lípidos, determinado a partir del aumento en los niveles de TBARS (68%) en los peces de Punta Lara. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la respuesta de la actividad de GST de las bogas colectadas de ambos sitios.

Respecto a los parámetros moleculares evaluados se observó que en las muestras provenientes de los peces inyectados con BNF (control positivo, β) y en la de los peces de Punta Lara (PL) se detectó la presencia del citocromo P450 1A mediante *Western blot*, en cambio no se observaron bandas reactivas en las muestras de los peces de los sitios de referencia (SRI y SRIII) (Figura 7.3). El anticuerpo policlonal anti-CYP1Ar reconoció una banda proteica con peso molecular similar (49-62 kDa) en los peces inyectados con BNF y en los de PL, esta banda coincide con el peso molecular reportado para la CYP1A de peces (55-65 kDa). La intensidad de las bandas de los peces de PL fue similar para las bogas y un 40% menor en las carpas respecto a la intensidad de la banda observada en de los peces luego de 48h de haber sido inyectados con BNF (β 48) (Figura 7.3 A, B). Al mismo tiempo, la expresión de CYP1A en las carpas expuestas en jaulas en PL fue 2,6 veces superior que en las carpas inyectadas con BNF luego de 24h (Figura 7.3 A). Los resultados que se muestran en la Figura 7.3 representan muestras de un ejemplar de cada tipo y sitio de exposición obteniéndose resultados similares para el resto de los ejemplares.

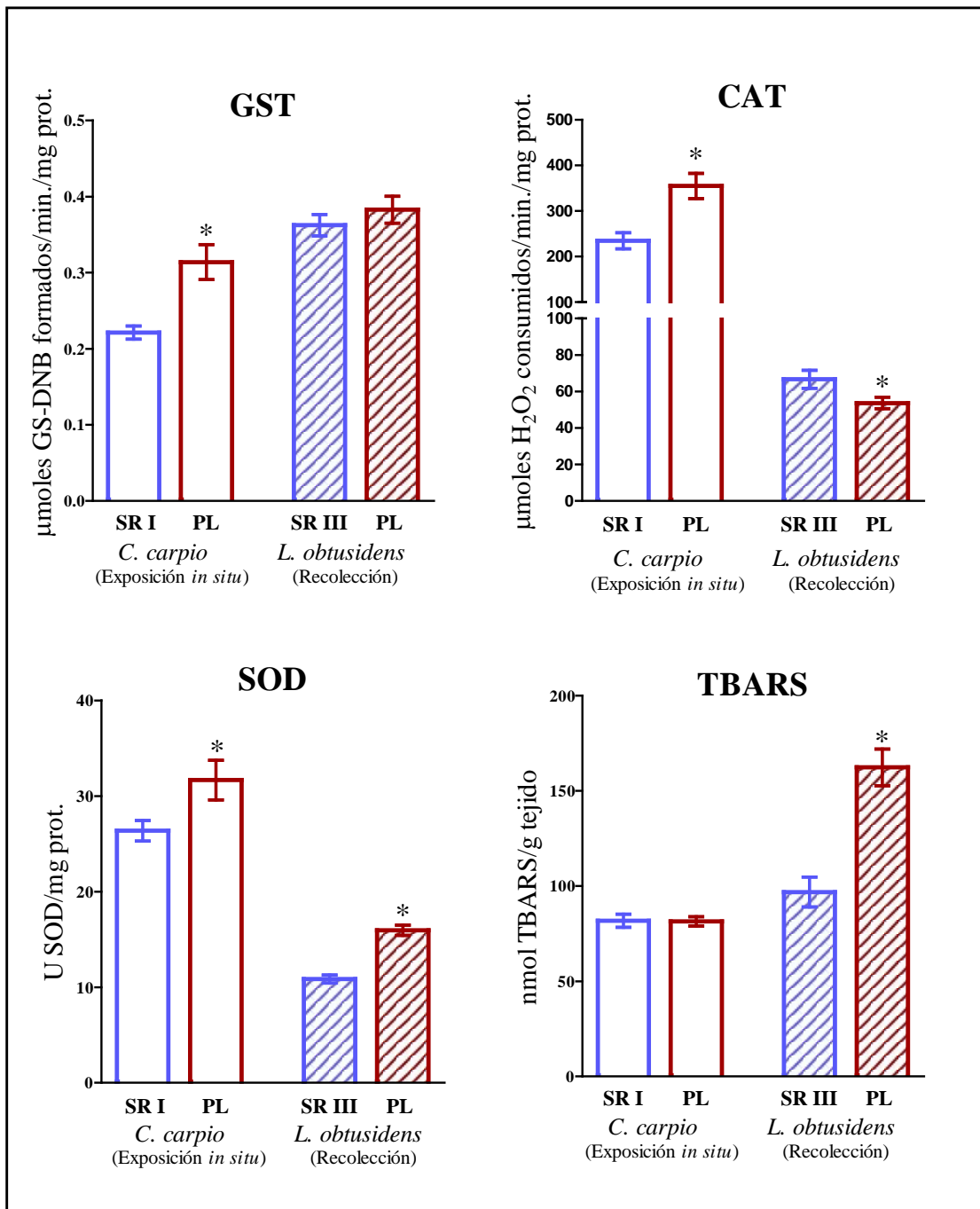


Figura 7.2. Biomarcadores bioquímicos de *C. carpio* y *L. obtusidens* evaluados luego de la exposición *in situ* y recolección de la zona costera de Punta Lara (PL) y sitios de referencia (SR I y SR III). Los datos se expresan como medias \pm ESM; $n=10$ y $n=11$ para cada grupo de *C. carpio* y *L. obtusidens* respectivamente. Las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales y de referencia de cada especie se evaluaron mediante *test t* de Student ($p < 0,05$). (*) Indica diferencias significativas respecto al sitio de referencia respectivo.

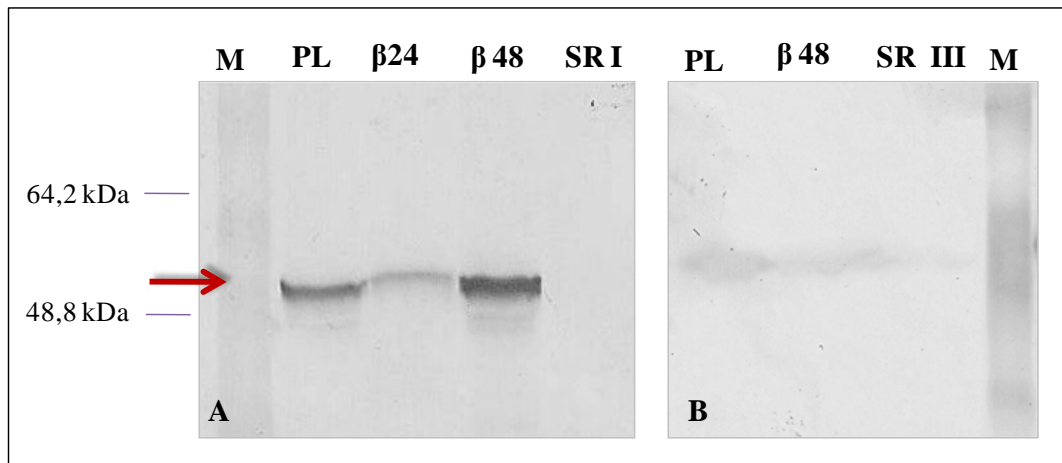


Figura 7.3: Inmunodetección por *Western blot* de la proteína CYP1A de *C. carpio* (A) y *L. obtusidens* (B). Fracción sobrenadante (FS) de muestras de peces expuestos y recolectados en Punta Lara (PL) y los sitios de referencia (SR I y SR III); β 24, 48: muestras de FS obtenidas 24 y 48 h luego de la inyección con β -naftoflavona (50mg/kg); M: marcador de peso molecular (*Page RulerTM. Prestained Protein Ladder*, Fermentas). (A): PL y RSI (150 y 160 μ g de proteína); β 24 y 48 (105 y 120 μ g de proteína). (B): PL y RSII (103 y 83 μ g de proteína); β 48 (113 μ g de proteína). La flecha indica la posición de la proteína CYP1A.

En el 2010, no se observaron diferencias significativas en los índices fisiológicos de los peces de Punta Lara respecto a los sitios de referencia tanto en las carpas expuestas en jaulas como en los sábalos capturados en el área de estudio (Tabla 7.2). Respecto a los biomarcadores bioquímicos analizados, se evidenció un incremento significativo en la actividad de todas las enzimas hepáticas evaluadas tanto en las carpas como en los sábalos en relación a los peces de los sitios de referencia respectivos (Figura 7.4). En particular se evidenció un efecto a nivel de biotransformación detectándose un incremento en la actividad de la GST de las carpas expuestas (33%) y de los sábalos capturados (71%) en Punta Lara. Por su parte luego de la exposición *in situ* de las carpas se observó un importante incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes tanto en CAT (45 %) como en SOD (77%) de los ejemplares que permanecieron en Punta Lara. Al mismo tiempo, los sábalos recolectados en el sitio experimental evidenciaron un incremento en la actividad de estas enzimas, principalmente a nivel de la CAT (29%) aunque no fue tan marcado. Así mismo en ambas especies se detectó daño oxidativo a nivel de lípidos evidenciado por el incremento de los niveles de TBARS de las carpas que permanecieron en jaulas (26%) y de los sábalos

recolectados (51%) en Punta Lara respecto a los sitios de referencia (Figura 7.4). Respecto a los parámetros moleculares en este caso también se detectó mediante *Western blot* la presencia del citocromo P450 1A en las muestras provenientes de las carpas que permanecieron expuestas *in situ* en Punta Lara (PL) (Figura 7.5). En los ejemplares de *C. carpio*, se evidenció una banda reactiva del peso molecular esperado (55 kDa) y de una intensidad similar a la observada en el control positivo inyectado con BNF, al mismo tiempo no se evidenció respuesta en los ejemplares expuestos en el sitio de referencia.

Tabla 7.2. Índices fisiológicos de *Cyprinus carpio* y *Prochilodus lineatus* luego de la exposición *in situ* y recolección en Punta Lara y sitios de referencia respectivamente (2010).

Índices fisiológicos	<i>Cyprinus carpio</i> (Exposición <i>in situ</i>)		<i>Prochilodus lineatus</i> (Recolección)	
	SR I	PL	SR IV	PL
Factor de Condición	1,03 ± 0,03 (11)	1,12 ± 0,03 (11)	1,21 ± 0,02 (10)	1,21 ± 0,04 (11)
Índice hepatosomático	1,29 ± 0,07 (11)	1,23 ± 0,04 (11)	0,85 ± 0,03 (10)	0,98 ± 0,14 (11)

Los datos se expresan como medias ± ESM, entre paréntesis se indica el número de muestras. Las diferencias estadísticas significativas entre los grupos de cada especie se evaluaron mediante *test t* de Student $p < 0,05$.

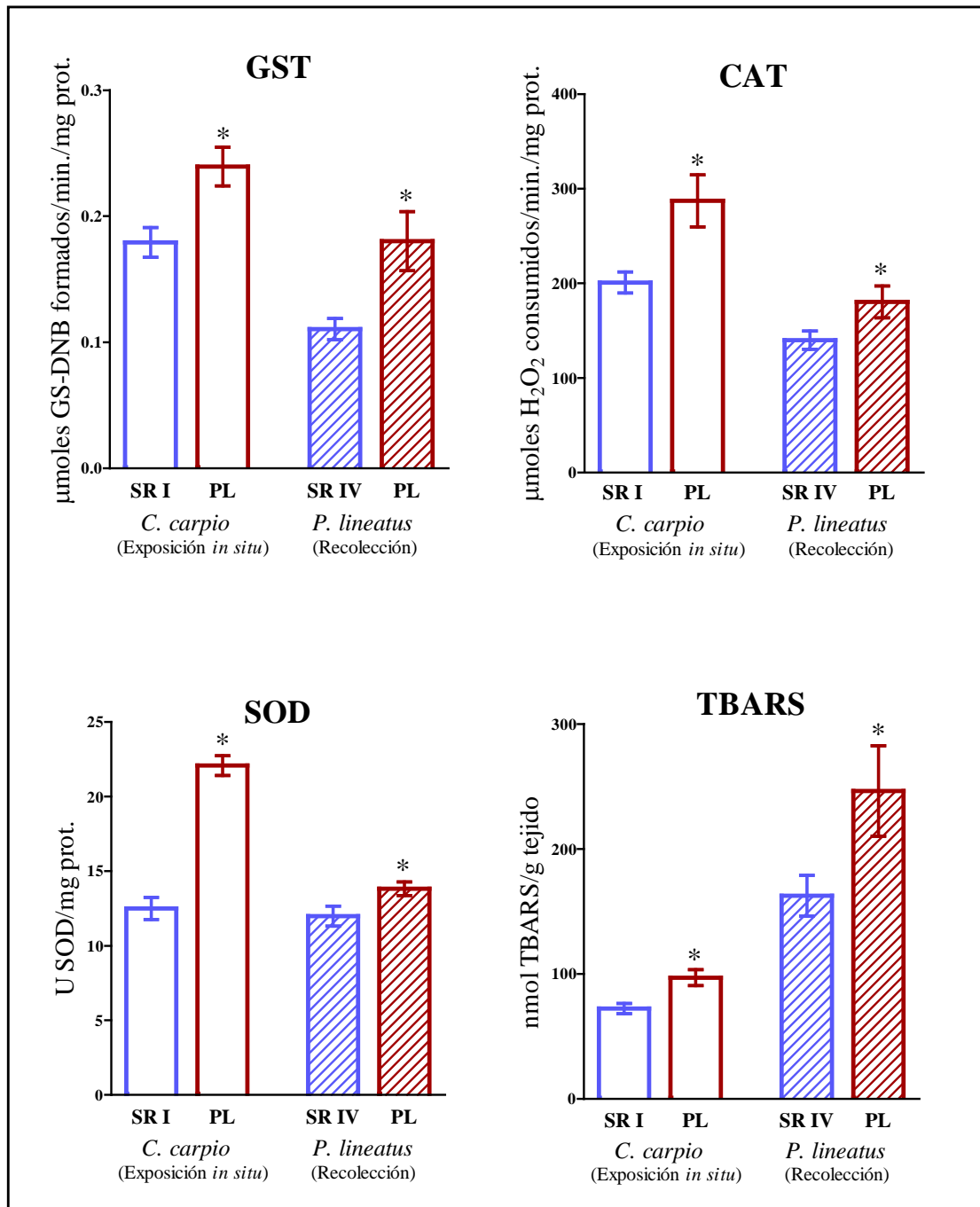


Figura 7.4. Biomarcadores bioquímicos de *C. carpio* y *P. lineatus* evaluados luego de la exposición *in situ* y recolección de la zona costera de Punta Lara (PL) y sitios de referencia (SR I y SR IV). Los datos se expresan como medias \pm ESM; $n=11$ y $n=10$ para cada grupo de *C. carpio* y *P. lineatus* respectivamente. Las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales y de referencia de cada especie se evaluaron mediante *test t* de Student ($p < 0,05$). (*) Indica diferencias significativas respecto al sitio de referencia respectivo.

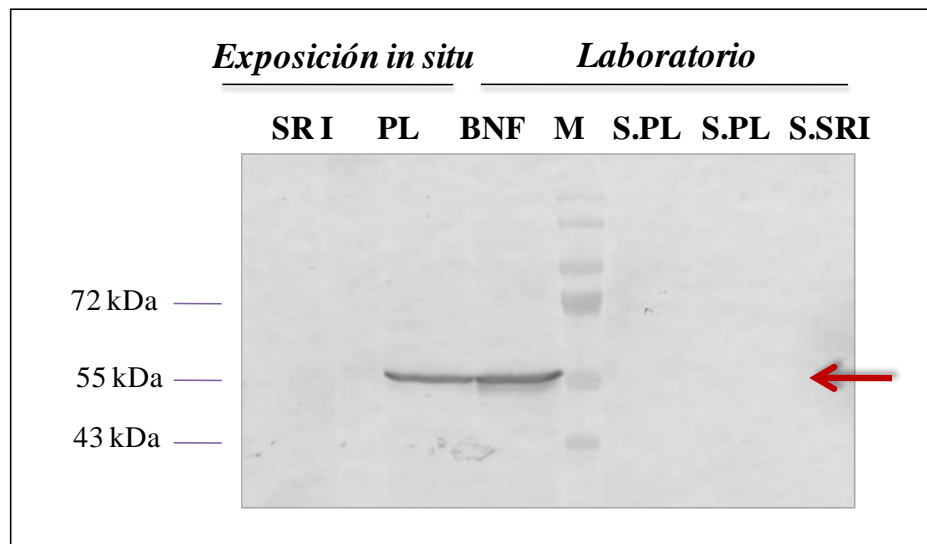


Figura 7.5: Inmunodetección por *Western blot* de la proteína CYP1A de *C. carpio* luego de la exposición *in situ* y a sedimentos de Punta Lara y el A° Las Flores como sitio de referencia. Fracción sobrenadante (FS) de muestras de peces expuestos *in situ* y a sedimentos de Punta Lara (**PL** y **S.PL**) y el A° Las Flores, SR I (**SRI** y **S. LF**); **BNF**: muestra de FS obtenida 48 h luego de la inyección con β -naftoflavona (50 mg/kg); **M**: marcador de peso molecular (*Page Ruler™. Prestained Protein Ladder*, Fermentas). La flecha indica la posición de la proteína CYP1A de *C. carpio*.

Exposición a sedimentos ambientales en condiciones de laboratorio

La exposición de 21 días de *C. carpio* al sedimento de Punta Lara en condiciones estándar de laboratorio no promovió cambios significativos en los índices fisiológicos (Tabla 7.3). Respecto a los parámetros bioquímicos se observó un importante incremento significativo en las enzimas antioxidantes tanto en CAT (52 %) como en SOD (78 %) de los peces que permanecieron en los acuarios con sedimento de Punta Lara, sin embargo no se observaron modificaciones en la actividad de GST ni en los niveles de TBARS (Figura 7.6). Por su parte, no se observó una respuesta del citocromo P450 1A ya que no se evidenciaron bandas reactivas en el los ejemplares expuestos al sedimento ambiental de Punta Lara (Figura 7.5). Sin embargo, el anticuerpo policlonal anti-CYP1Ar reconoció una banda proteica en los peces inyectados con BNF y los que permanecieron expuestos en PL de forma simultánea.

Tabla 7.3. Índices fisiológicos de *C. carpio* luego de 21 días de exposición a sedimento superficial de Punta Lara y el A° Las Flores en condiciones estándar de laboratorio.

Índices fisiológicos	Sedimento A° Las Flores	Sedimento Punta Lara
Factor de Condición	1,30 ± 0,03 (10)	1,27 ± 0,02 (10)
Índice hepatosomático	2,10 ± 0,07 (10)	2,16 ± 0,08 (10)

Los datos se expresan como medias ± ESM, entre paréntesis se indica el número de muestras. Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron mediante el *test t* de Stuent ($p < 0,05$).

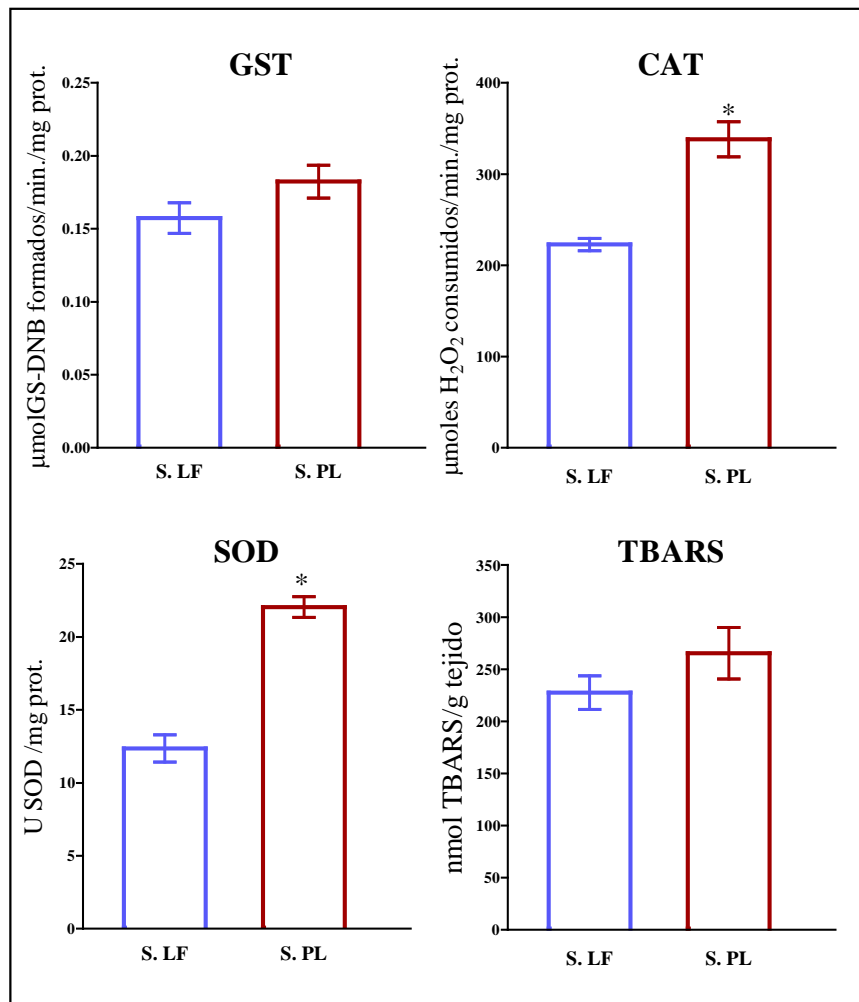


Figura 7.6. Biomarcadores bioquímicos de *C. carpio* evaluados luego de la exposición a sedimento de Punta Lara bajo condiciones estándar de laboratorio. **S. LF**, peces en acuario con sedimento control proveniente del arroyo Las Flores; **S. PL**, peces en acuario con sedimento proveniente de Punta Lara. Los datos se expresan como medias ± ESM; $n=10$ para cada grupo. Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron mediante *test t* de Student ($p < 0,05$). (*) Indica diferencias significativas respecto al control.

Parámetros fisicoquímicos y caracterización de sedimentos

En la Tabla 7.4 se muestran valores registrados de los parámetros fisicoquímicos del agua del Río de la Plata en la zona costera de Punta Lara y de los sitios de referencia determinados en laboratorio o en campo durante los dos períodos experimentales. En los parámetros medidos en campo se observaron valores similares de temperatura, pH y oxígeno disuelto aunque los valores de conductividad registrados en Punta Lara fueron menores. Por su parte, en las muestras de agua de Punta Lara se encontraron concentraciones mayores tanto de NH_4^+ y NO_2^- así como de MPS y MOP en comparación a los sitios de referencia en condiciones de campo principalmente durante el 2007. En particular los valores de NO_2^- fueron superiores a los niveles guía para la protección de la vida de agua dulce según la Ley 24051. Cabe destacar que los valores de los parámetros evaluados en el arroyo Las Flores se encontraron dentro de los límites permitidos tanto por la Ley 24051 como para la Ley 19587 de Higiene y Seguridad para agua potable. En condiciones de laboratorio también se registraron valores de NH_4^+ y NO_2^- más elevados en las muestras de agua del acuario con sedimento de Punta Lara en relación con el del sitio de referencia. Sin embargo los valores de MPS y MOP fueron más elevados en el acuario con sedimento del sitio de referencia.

La caracterización del sedimento superficial de Punta Lara (PL) y los sitios de referencia se presenta en la Figura 7.7 y las Tablas 7.5, 7.6, 7.7 y 7.8. La composición granulométrica del sedimento de Punta Lara evidenció una diferencia entre los períodos 2007 y 2010. En el primer ensayo (PL 2007) se observa un sedimento limo-arenoso con un predominio de la fracción más fina (59 % limo) y un 3,5 % de contenido de materia orgánica, mientras que el sedimento de PL 2010 presenta un predominio de arena (92%) y una menor fracción de finos de las tres clases principales de sedimento (arena, limo y arcilla), al igual que una menor cantidad de MO. Al mismo tiempo, el sedimento superficial del arroyo Las Flores (SR I) mostró una fracción mayor de arena (60%) aunque al mismo tiempo evidenció un gran aporte de limo y arcilla siendo este sitio el que presenta una fracción mayor de arcillas (15%) en relación al resto de los sedimentos analizados; por su parte este sedimento presentó una mayor cantidad de MO (Figura 7.7).

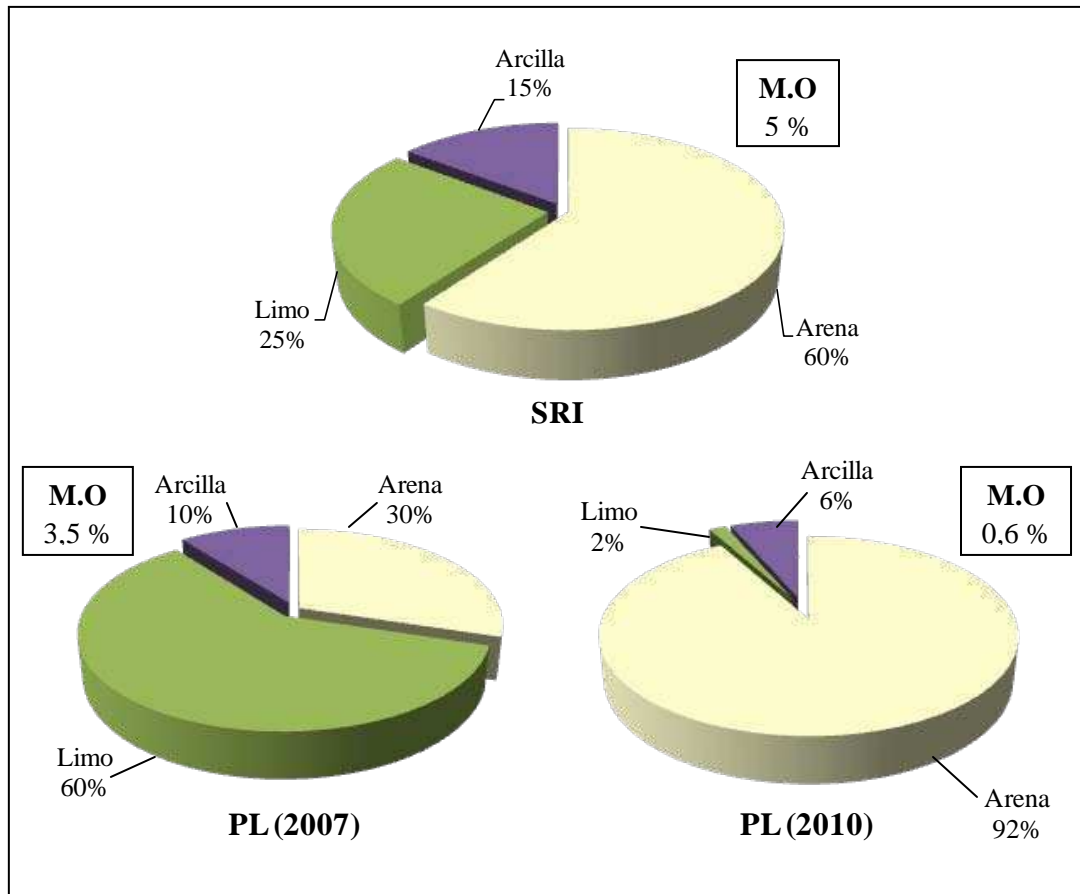


Figura 7.7. Composición granulométrica y contenido de materia orgánica (M.O) del sedimento superficial del A° Las Flores (SR I) y Punta Lara (PL) en los dos períodos de ensayo (2007 y 2010). Los datos se expresan como porcentaje (%).

En la Tabla 7.5 se indica la concentración de PCBs totales, HAPs, HAs, índices de distribución de alcanos y la presencia de metales pesados en el sedimento superficial de Punta Lara determinados durante el 2007. El análisis de la capa superficial del sedimento de Punta Lara, reveló la presencia de HAPs y PCBs totales. En el caso de los hidrocarburos, las concentraciones encontradas fueron bajas respecto a los valores guía recomendados para la vida acuática por Canadá (CCME, 1999-2002), en cambio los niveles de PCBs superaron dichos los valores. Por otro lado se detectó una concentración de hidrocarburos alifáticos totales (59660 ng/g p.s.) de los cuales sólo un 20% resultó identificable, mientras que el resto representó una mezcla compleja sin resolver (UCM). Los niveles relativamente elevados de UCM podrían ser atribuíos a fuentes de hidrocarburos tales como el vertido de aguas

residuales o la proximidad al puerto. Los índices de los alcanos permiten determinar el posible origen de los hidrocarburos en el sedimento. Según Colombo y col. (1989) y Lavarías y col. (2005) la proporción de hidrocarburos de bajo/ alto peso molecular es cercano a 1,0 en algas, plancton y petróleo crudo, mientras que las bacterias sedimentarias, animales marinos, plantas superiores y sedimentos muestran valores más bajos ($<1,0$). En nuestro estudio, este índice mostró valores bajos (0,1). Al mismo tiempo, el índice de *AlK/Iso* evalúa la presencia de petróleo y la biodegradación de los *n*-alcanos. Valores bajos de este índice, son indicadores de la presencia de petróleo degradado, mientras que los valores altos representan una degradación baja. En este trabajo, se obtuvo un valor de 0,1 para este índice (Tabla 7.5). Por su parte se detectó la presencia de metales pesados en el sedimento superficial de la costa de Punta Lara (Tabla 7.5) si bien la mayoría de ellos se encuentra dentro de los niveles guía sugeridos por Canadá (CCME, 1999-2002) el Cr presentó valores (50 $\mu\text{g/g}$) que superaron dichos niveles guía (37,3 $\mu\text{g/g}$).

Tabla 7.4. Parámetros fisicoquímicos del agua del Río de la Plata (Punta Lara) y sitios de referencia determinados en campo o en laboratorio.

Parámetros	<i>Exposición in situ y recolección</i>						<i>Laboratorio</i>	
	2007			2010			S. LF	S. PL
	SR III	SR I	PL	SR IV	SR I	PL		
Temperatura (°C)	24±1	26 ± 1	27±2	22±1	24±2	25±1	22±1	22±1
OD (mg/L)	7,7±0,8	6,9 ± 0,7	6,9±0,4	9,0±0,8	6,4±0,2	7,3±0,3	--	--
pH	8,2±0,1	7,5 ± 0,4	7,2±0,2	7,8±0,6	7,9±0,2	8,2±0,1	--	--
Conductividad (µS/cm)	669±1	754 ± 32	421±59	524±56	--	--	--	--
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	0,02±0,01	0,04±0,01	0,07±0,03	0,13±0,04	0,01±0,01	0,01±0,01	0,09±0,01	0,10±0,03
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	0,04±0,02	0,04±0,01	0,10±0,03	0,01±0,01	0,04±0,01	0,06±0,03	0,04±0,02	0,14±0,06
PRS (mg/L)	0,08±0,03	0,49±0,06	0,26±0,02	--	0,33±0,15	0,18±0,1	0,11±0,05	0,35±0,18
MPS (mg/L)	--	11,6	32,4	26,7	14±2	32±6	640±201	7,6±4,9
MOP (mg/L)	--	1,8	3,8	5	4±1	7±1	84±32	3,9±1,1

Los datos se presentan como medias ± ES (n=3).

Tabla 7.5. Caracterización del sedimento de diversos sitios de América Latina con especial énfasis en el estuario del Río de la Plata.

Sitios	PCB _{s T} (ng/g)	HAPs _T (ng/g)	HAs (ng/g p.s)		Índices			Metales (µg/g)					Referencias
			UCM	Totales	Alk /Iso	BPM/ APM	ICP	Cr	Cu	Zn	Pb	Ni	
PL	50	50	49730	59660	0,1	0,1	1,5	50	5	35	7	5	presente estudio, 2007
PL/Z.A	39	630	76800	79160	0,3	0,1	2,1						Colombo y col., 1989
		350											Colombo y col., 2005a Colombo y col., 2006
A.C	61	31800											Colombo y col., 2005a Colombo y col., 2006
		555000	2230000	2876000	0,7	2,2	1,4						Colombo y col., 1989 Colombo y col., 1990
C.O-R.S	998	Hidrocarburos _T : 22361µg/g						2,5	55,8	387,3	124,7	39,7	Ronco y col., 2008
Pto. M		(1800- 90400)	(11100- 55900)	(21100- 119700)			(0,9- 1,1)	(80- 170)	(60- 110)	(170- 380)	(40- 110)	(29-32)	Muniz y col., 2004
B.G	184	(80- 7750)											da Silva y col., 2007
													Santos de Souza y col., 2008
LF		HC. totales <200µg/g						15,5	8,1	32,0	22,2	2,3	Ronco y col., 2008
NGCS	34,1	0,468						37,3	35,7	123	35,0	18	CCME, 1999-2002

PL: Punta Lara (sitio de estudio); Z.A: zonas aledañas a Punta Lara; A.C: área central del Río de la Plata (Argentina); C.O-R.S: Canal Oeste-Río Santiago (Argentina); Pto. M: Puerto de Montevideo (cuatro sitios de muestreo), estuario del Río de la Plata (Uruguay); B.G: Bahía de Guanabara (Brasil); LF: arroyo Las Flores (sitio de referencia, SR I); PCBs_T: bifenilos policlorados totales; HAPs_T: hidrocarburos aromáticos policíclicos totales; HAs: hidrocarburos alifáticos; Hidrocarburos_T: hidrocarburos totales; UCM: mezcla compleja no resuelta; Alk/Iso: índice ($\sum n-C14-n-C18 / \sum$ cinco isoprenoides); BPM/APM: índice hidrocarburos de bajo/alto peso molecular; ICP: índice del carbono preferido; NGS: niveles guía de calidad de sedimento.

En los ensayos realizados en el 2010 se realizó una caracterización de los HAPs, congéneres de PCBs y se añadió un análisis de pesticidas organoclorados (POCs) del sedimento superficial y en el MPS de Punta Lara y los sitios de referencia. En la Tabla 7.6 se presentan los niveles de los distintos HAPs de 2, 3, 4, 5 y 6 anillos encontrados en los sitios de estudio. Los niveles de HAPs detectados en todos los sitios de estudio se encuentran por debajo de los niveles guía para la calidad de sedimentos sugeridos por Canadá (CCME, 1999-2002). Las concentraciones totales de HAPs, consideradas como la suma de 22 compuestos tanto metilados como parentales, evidenciaron concentraciones bajas similares a las que suelen ser reportadas en sitios de referencia (Martins y col., 2005). Sin embargo, las muestras naturales son muy complejas y las concentraciones de HAPs totales podrían representar diferentes orígenes de los mismos en el sedimento. Por lo tanto, para determinar el posible origen de los HAPs presentes en los sitios de estudio se emplearon diferentes índices de evaluación los cuales se describen en la Tabla 7.7. Según el índice Fen/Ant en los tres sitios evaluados los HAPs presentes en el sedimento son de origen pirogénico, es decir el resultado de la combustión incompleta de la materia orgánica. Por su parte, tanto el índice Fl/Fl+Pir como la tasa entre Petr/Piro estarían indicando la presencia de HAPs de origen pirogénico en los sitios de referencia (SR I y SR I), mientras que en Punta Lara los HAPs presentes en el sedimento serían de origen petrogénico, introducidos en el ambiente como consecuencia de las operaciones y usos del petróleo y sus derivados. Al mismo tiempo tanto el índice BaA/BaA+Cr como la concentración de perileno respecto a la del resto de los penta isómeros ($\% \text{ Per}/\Sigma\text{penta}$) estarían evidenciando un origen diagénico de los HAPs presentes tanto en SR I como en SR IV. Esto último también se evidencia en la Tabla 7.6, donde se observa una elevada concentración de perileno en el sedimento de SR I, siendo éste el HAP más representado y el que más aporta a la concentración de HAPs totales de este sitio.

Cabe destacar que el perileno también es producido por degradación *in situ* de precursores biogénicos, siendo el HAP diagénico más importante que se encuentra en sedimentos ambientales por lo tanto una alta concentración de perileno con respecto a otros HAPs puede indicar un importante origen natural del compuesto (Readman y col., 2002). Respecto al MPS no se detectaron HAPs adsorbidos al material particulado de SR IV, mientras que en PL se detectó 2,33 ng HAPs/g de material particulado en suspensión, con un mayor aporte de los compuestos petrogénicos, HAPs de bajo PM (2 y 3 anillos).

En la Tabla 7.8 se presenta la caracterización de los compuestos organoclorados PCBs y pesticidas organoclorados (POCs) del sedimento superficial y MPS de los sitios de estudio. Los niveles de PCBs totales (Σ PCBs) en los tres sitios evaluados se encuentran por debajo de los niveles guía para la calidad de sedimentos sugeridos por Canadá (CCME, 1999-2002). Al mismo tiempo, los niveles de PCBs encontrados en el sedimento superficial de Punta Lara fueron mayores, el doble a los detectados en los sitios de referencia (SR I y SR IV). La misma tendencia se evidencia en los niveles de PCBs detectados en el MPS. Respecto a los POCs totales se evidenció una mayor concentración en el sedimento superficial y el MPS de Punta Lara con un mayor aporte de γ -HCH, p,p'-DDD y mirex.

Tabla 7.6. Caracterización de HAPs en el sedimento superficial y MPS de Punta Lara y sitios de referencia en el 2010.

#	HAPs (ng/g p.s)	<i>Sedimento superficial</i>				<i>MPS</i>	
		SR I	SR IV	PL	NGCS	SR IV	PL
2 -Anillos	Naftaleno	5,82	0,01	4,65	34,6	ND	ND
	2-metil naftaleno	0,87	0,43	ND	20,2	ND	ND
	1-metil naftaleno	0,95	0,66	3,33	--	ND	ND
	2,6-dimetil naftaleno	1,44	0,39	ND	--	ND	ND
	Bifenil	0,30	0,23	3,91	--	ND	0,82
3 -Anillos	Acenaftileno	0,08	ND	4,29	5,78	ND	ND
	Acenafteno	0,11	0,15	ND	6,71	ND	ND
	Fluoreno	0,28	ND	ND	21,2	ND	ND
	Fenantreno	1,47	0,47	7,41	41,9	ND	0,33
	Antraceno	0,19	0,46	5,52	46,9	ND	0,54
4 -Anillos	Fluoranteno	2,39	0,88	4,68	111	ND	ND
	Pireno	2,21	1,3	5,48	53	ND	0,63
	Benzo(a)antraceno	0,74	0,28	ND	37,7	ND	ND
	Criseno	2,01	1,43	ND	57,1	ND	ND
5 -Anillos	Benzo(b)fluoranteno	2,03	1,43	ND	--	ND	ND
	Benzo(k)fluoranteno	0,56	0,81	3,74	--	ND	ND
	Benzo(e)pireno	0,98	1,42	ND	--	ND	ND
	Benzo(a)pireno	8,58	0,58	ND	31,9	ND	ND
	Perileno	32,9	1,9	8,29	--	ND	ND
6-A	Dibenzo(a,h)antraceno	1,80	0,48	ND	6,22	ND	ND
	Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,48	0,29	ND	--	ND	ND
	Benzo(g,h,i)perileno	4,13	ND	ND	--	ND	ND
Σ HAPs		70,33	13,61	51,30		ND	2,33

SR I: sedimento del sitio de referencia °A Las Flores; SR IV: sedimento del sitio de referencia A° Guayracá; PL: sedimento de Punta Lara (Río de la Plata); # cantidad de anillos aromáticos; NGCS: niveles guía de calidad de sedimento para la protección de la vida acuática de Canadá (CCME, 1999-2002). MPS: material particulado en suspensión; ND: no detectado

Tabla 7.7. Índices de evaluación del origen de los HAPs registrados en los sitios de estudio y valores de referencia.

Índices	SR I	SR IV	PL	Rango	Origen	Referencia
Fen/Ant	7,59	1,01	1,3 4	< 10 > 15	Pirogénico Petrogénico	<i>Readman y col., 2002</i>
Fl/Fl+Pir	0,5	0,7	0,4	> 0,5 < 0,4	Pirogénico Petrogénico	<i>Colombo y col., 2006</i>
BaA/BaA+Cr	0,3	0,2	ND	> 0,35 < 0,2 (0,2-0,35)	Pirogénico Petrogénico Diagénico	<i>Colombo y col., 2006</i>
% Per/ Σ penta	73	37	68	> 10% < 10 %	Pirogénico Petrogénico	<i>Readman y col., 2002</i>
Petro/Piro	0,7	0,7	3,7			<i>Colombo y col., 2005b</i>

SR I: sedimento del sitio de referencia °A Las Flores; SR IV: sedimento del sitio de referencia A° Guayracá; PL: sedimento de Punta Lara (Río de la Plata); Fen/Ant: concentración de fenantreno/antraceno; Fl/Fl+Pir: concentración de fluoranteno/(fluoranteno+pireno); BaA/BaA+Cr: concentración de benzo(a)antraceno/(benzo(a)antraceno+criceno); % Per/ Σ penta: % de Perileno/ Σ penta isómeros; Petro/Piro: concentración HAPs petrogénicos (HAPs de bajo PM, 2 y 3 anillos y HAPs metilados)/ concentración HAPs pirogénicos (HAPs de alto PM, 4, 5 y 6 anillos).

Tabla 7.8. Caracterización de compuestos organoclorados del sedimento superficial y MPS de Punta Lara y sitios de referencia en el 2010.

PCB # (ng/g p.s)		Sedimento superficial			MPS	
		SR I	SR IV	PL	SR IV	PL
triCB	17	<LD	0,01	(<LD-0,01)	<LD	<LD
	18	(<LD-0,16)	<LD	<LD	<LD	<LD
	31	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	28+33	<LD	0,03	(0,01-0,03)	0,05	<LD
tetraCB	52	<LD	0,01	(<LD-0,01)	<LD	(<LD-0,01)
	49	(<LD-0,02)	0,03	(<LD-0,03)	<LD	(<LD-0,06)
	44	<LD	0,02	(<LD-0,02)	0,05	(<LD-0,09)
	74	<LD	0,04	(<LD-0,04)	<LD	<LD
	70	(<LD-0,05)	0,01	(<LD-0,01)	<LD	<LD
pentaCB	95	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	101	<LD	0,01	(0,01-0,05)	<LD	<LD
	99	<LD	<LD	(<LD-0,09)	<LD	<LD
	87	<LD	0,01	(0,01-0,2)	<LD	(<LD-0,05)
	110	<LD	ND	<LD	<LD	(<LD-0,01)
	107	<LD	ND	<LD	<LD	<LD
	82+151	<LD	ND	<LD	<LD	(<LD-0,02)
	118	<LD	ND	<LD	<LD	<LD
hexaCB	149	(<LD-0,02)	0,02	(<LD-0,02)	<LD	<LD
	53+105+132	<LD	0,01	<LD	<LD	(<LD-0,02)
	138 +158	<LD	ND	(<LD-0,03)	<LD	(<LD-0,01)
	128	<LD	0,05	(0,01-0,05)	<LD	(<LD-0,02)
	156	<LD	ND	<LD	<LD	<LD
heptaCB	171	<LD	ND	(<LD-0,01)	<LD	<LD
	177	<LD	<LD	(<LD-0,01)	<LD	<LD
	180	<LD	0,01	(<LD-0,01)	<LD	<LD
	183	<LD	0,01	(0,01-0,03)	<LD	<LD
	187	<LD	<LD	<LD	<LD	(<LD-0,02)
	191	<LD	0,01	(0,01-0,15)	<LD	(<LD-0,01)
	169	<LD	0,01	(<LD-0,01)	<LD	<LD
	170	(<LD-0,03)	<LD	<LD	<LD	<LD
octaCB	199	<LD	ND	<LD	<LD	<LD
	195	<LD	<LD	(<LD-0,06)	<LD	<LD
	194	<LD	0,01	(<LD-0,01)	<LD	<LD
	205	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
nona CB	208	<LD	0,02	(<LD-0,02)	<LD	(<LD-0,01)
	206	(<LD-0,06)	0,01	(<LD-0,01)	<LD	<LD
ΣPCBs		(<LD-0,34)	0,33	(0,06-0,69)	0,1	(<LD-0,33)

Tabla 7.8 (Continuación)

POCs (ng/g p.s)	<i>Sedimento superficial</i>			<i>MPS</i>	
	SR I	SR IV	PL	SR IV	PL
HCB	<LD	0,01	(<LD-0,02)	ND	ND
α-HCH	<LD	ND	(<LD-0,02)	ND	ND
β-HCH	<LD	ND	<LD	ND	<LD
γ-HCH	<LD	0,04	(0,03-0,79)	ND	(<LD-0,03)
δ-HCH	<LD	0,23	(<LD-0,04)	ND	<LD
Heptacloro	<LD	ND	<LD	<LD	(<LD-0,02)
Heptacloro epóxido	<LD	0,02	(<LD-0,01)	ND	<LD
α-clordano	<LD	ND	<LD	ND	<LD
γ-clordano	<LD	<LD	(<LD-0,01)	ND	<LD
p,p'-DDT	<LD	<LD	<LD	ND	<LD
o,p'-DDE	<LD	0,02	(<LD-0,03)	ND	<LD
p,p'-DDD	<LD	0,02	(<LD-0,01)	ND	(<LD-0,07)
p,p'-DDE/o,p'-DDD	<LD	ND	(<LD-0,01)	ND	ND
Endosulfán I	<LD	ND	<LD	<LD	<LD
Endosulfán II	<LD	ND	<LD	<LD	ND
Endosulfán sulfato	<LD	0,02	<LD	ND	ND
Aldrin	<LD	0,05	(<LD-0,02)	ND	(<LD-0,02)
Dieldrin	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Endrin	<LD	ND	<LD	ND	ND
Endrin cetona	<LD	ND	<LD	<LD	<LD
Mirex	<LD	0,09	(<LD-0,14)	<LD	<LD
ΣPOCs	<LD	0,61	(0,03-1,11)	<LD	(<LD-0,14)

SR I: sedimento del sitio de referencia A° Las Flores; SR IV: sedimento del sitio de referencia A° Guayracá; PL: sedimento de Punta Lara (Río de la Plata); *MPS*: material particulado en suspensión; ND: no detectado; LD: límite de detección; PCBs #: número de cada congénere de PCB; POCs: pesticidas organoclorados. Entre paréntesis se indican los valores mínimos y máximos detectados. Niveles Guía de Calidad de Sedimento (NGCS en ng/g): PCBs totales, 34,1; γ-HCH 0,94; Heptacloro epóxido 0,60; DDD 3,54; DDE 1,42; DDT 1,19; Dieldrin 2,85; Endrin 2,67 (CCME, 1999-2002).

Evaluación de la respuesta integrada de los parámetros biomarcadores de *C. carpio* mediante el Análisis de discriminante

Con el objeto de comparar y discriminar la incidencia de las respuestas de los biomarcadores respecto a las distintas condiciones de exposición de los ejemplares de *C. carpio in situ* y a sedimento ambiental (Punta Lara y A° Las Flores) en condiciones de laboratorio, se realizó un análisis integrado de las respuestas biológicas obtenidas mediante el análisis discriminante canónico (Figura 7.8). Se construyó una matriz de datos incluyendo la respuesta de 6 parámetros biomarcadores de *C. carpio* como variables independientes y 4 condiciones experimentales (incluyendo los dos sitios de muestreo, PL - LF y los dos tipos de exposición, campo y laboratorio) como variables de agrupación. De este análisis surgió que las variables que contribuyeron significativamente a la discriminación entre los grupos experimentales fueron las siguientes: IHS, CAT, SOD y TBARS ($p < 0,01$). En la Tabla 7.9 se presenta el resumen de las funciones canónicas discriminantes, los autovalores, el % de la varianza que explica cada una, así como las variables biológicas que contribuyeron significativamente en la discriminación de los resultados así como el peso individual de cada una. La Figura 7.8 muestra una representación gráfica de los valores de funciones discriminantes canónicas para los individuos expuestos a las distintas condiciones experimentales. Las dos primeras funciones canónicas discriminantes fueron suficientes para dar cuenta de casi la totalidad de las diferencias entre grupos ya que explicaron el 99,4% de la varianza total. En particular las diferencias significativas entre tipo de exposición se describen principalmente por el primer eje canónico, el cual explica un 75% de la varianza total, siendo el IHS y los niveles de TBARS los parámetros biomarcadores que más contribuyeron a dicha separación. Por su parte, las diferencias significativas entre los sitios (experimental, PL y de referencia, LF) se explican por la segunda función canónica siendo en este caso la actividad de la SOD la variable que más contribuye a la separación entre sitios. Cabe destacar que según la matriz de clasificación el 100% de los casos fueron clasificados correctamente.

Tabla 7.9. Resumen del Análisis discriminante.

Parámetros (variables independientes)	Primera Función		Segunda Función		%VAR _T acumulada
	Canónica (Root 1)		Canónica (Root 2)		
	Coef. estandar	%VAR _T	Coef. estandar	%VAR _T	
log FC	-0,24	75,2	0,09	24,2	99,4
log IHS*	-0,58		0,37		
log CAT*	-0,56		-0,29		
log GST	0,10		-0,36		
log SOD*	0,30		-0,82		
log TBARS*	-0,78		-0,31		
Autovalor = 15,93			Autovalor = 5,13		

Coef. estandar, coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes; %VAR_T, % de varianza total; (*) Indica parámetros biomarcadores que contribuyeron significativamente en las dos primeras funciones discriminantes.

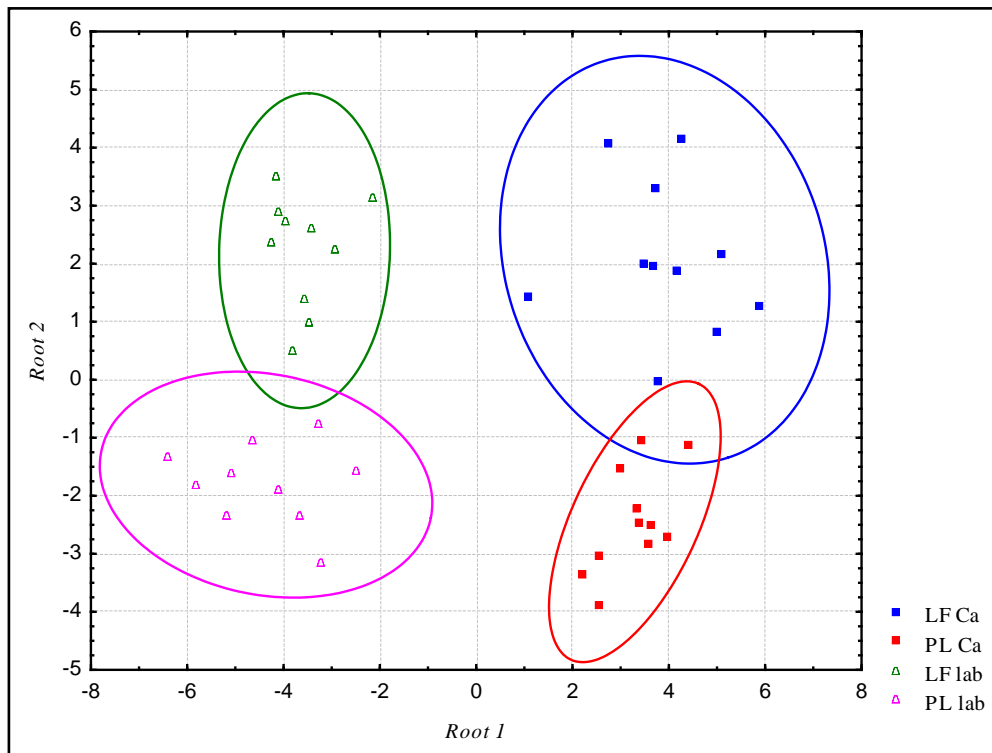


Figura 7.8. Análisis discriminante. Segregación de la respuesta integrada de *C. carpio* utilizando todos los parámetros biomarcadores en función a las distintas condiciones experimentales ensayadas. LF Ca y PL Ca, exposición *in situ* en el arroyo Las Flores y Punta Lara en campo; LF lab y PL lab, exposición en laboratorio a sedimento del arroyo Las Flores y Punta Lara.

7.3 Estudios en el tramo medio del río Luján

7.3.1 Materiales y Métodos

7.3.1.1 Área de estudio

Los ensayos se realizaron en dos sitios del curso medio del río Luján en el partido de Luján. El primer sitio (S1) localizado aguas arriba de la descarga de la planta depuradora municipal de la ciudad de Luján recibe el aporte principalmente de la industria textil debido a la influencia del arroyo Gutiérrez (Giorgi y col., 2002). El segundo sitio (S2) recibe los efluentes de la planta depuradora ya que se encuentra aguas abajo de la misma. Como sitio de referencia se utilizó el arroyo Las Flores (SR I) y el arroyo Durazno (SR II) como se describió en la sección 3.2.2-a (Figura 7.9).

7.3.1.2 Diseño experimental

Se utilizaron ejemplares juveniles de *C. carpio* como especie estandarizada ($n = 33$; $3,7 \pm 0,1$ g p.c.) y de la especie nativa *P. laticeps* ($n = 50$; $4,8 \pm 0,1$ g p.c.). Los peces permanecieron durante dos semanas previas a los ensayos en el período de aclimatación en condiciones estandarizadas de laboratorio como se describe en la sección 3.2.

a- Ensayo in situ con C. carpio: ejemplares juveniles de la especie estandarizada fueron expuestos por 14 días durante la primavera de 2007 en forma simultánea en los sitios S1 y S2 del río Luján y en el sitio de referencia SR II. Se utilizaron jaulas como las descritas en la sección 3.2.2-a, las cuales permanecieron a una distancia aproximada de 10 cm del fondo de los cuerpos de agua mantenidas por medio de lastre. Se colocaron 11 carpas por jaula con una densidad de carga de 2 g/L en cada una.

b- Ensayo in situ con P. laticeps: de forma similar, juveniles de la especie nativa ($n=8$; 2g p.c/L) fueron expuestos a los mismos sitios experimentales S1 y S2 bajo las mismas condiciones experimentales durante el otoño de 2008, mientras que el grupo de referencia permaneció en el sitio SR I. En este caso, para poder analizar el objetivo 4 del presente capítulo, luego de 7 días de exposición un grupo de 8 ejemplares de cada sitio fue muestreado y el resto permaneció expuesto durante 14 días.

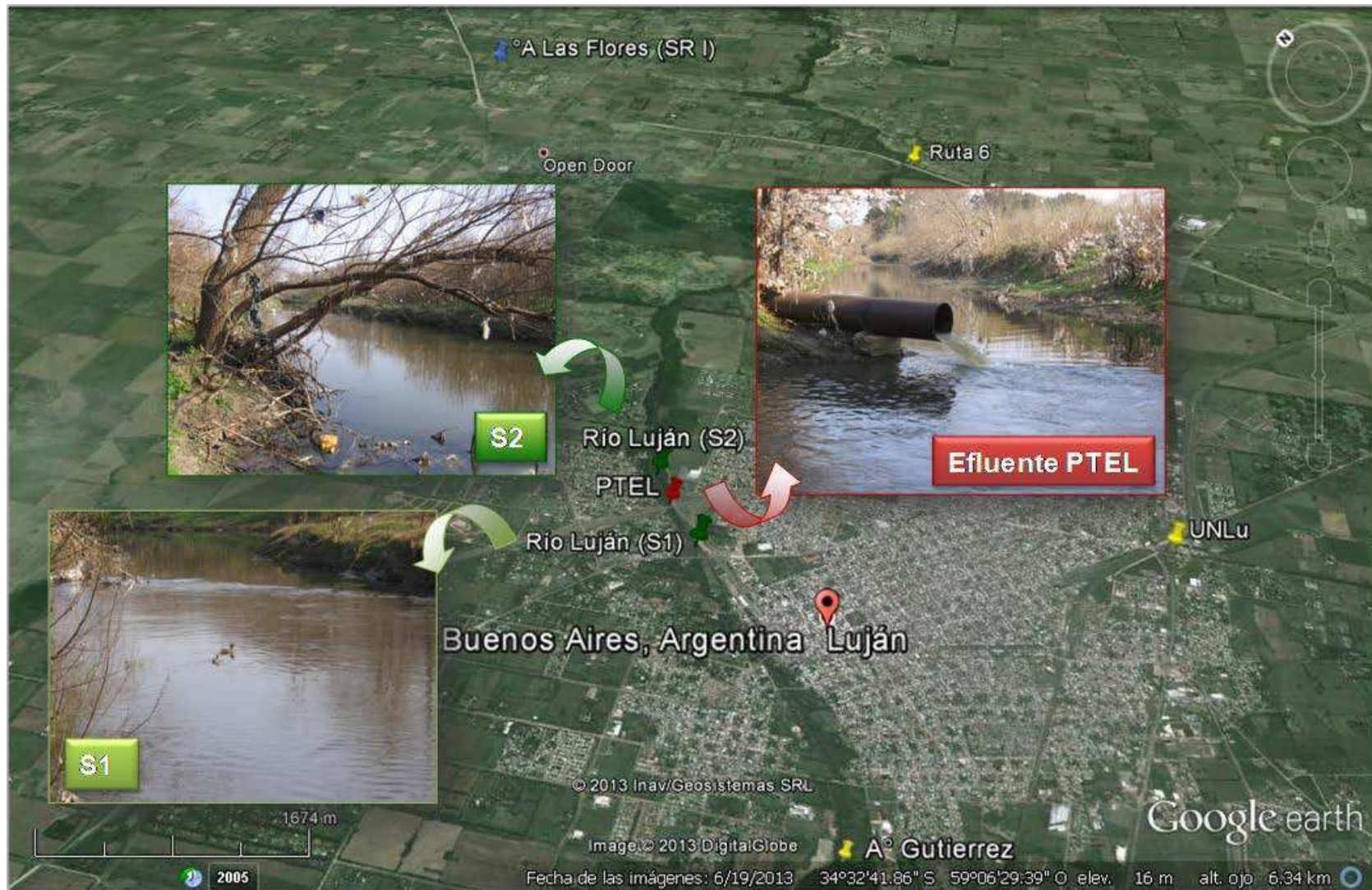


Figura 7.9 Imagen satelital del tramo medio del río Luján. **S1** y **S2**, sitios experimentales donde se llevaron a cabo los ensayos en jaulas aguas arriba y abajo de la planta de tratamiento de efluentes líquidos (**PTEL**) municipal respectivamente.

7.3.1.3 Parámetros biomarcadores

Se determinaron los índices fisiológicos (FC e IHS) tal como fueron descritos en el capítulo 3, sección 3.4.1. Se evaluaron los biomarcadores asociados a la biotransformación como la actividad enzimática de GST y la inmunodetección de la proteína CYP1A según han sido descritos en la sección 3.4.2. Asociados al estrés oxidativo se evaluó la actividad enzimática de la CAT y SOD así como los niveles de TBARS siguiendo las condiciones ya descritas en la sección 3.4.3. Por último en este capítulo se evaluó por medio de inmunodetección la presencia de la proteína Vtg como biomarcador asociado a la presencia de compuestos desorganizadores endócrinos, en este caso se utilizó el anticuerpo monoclonal comercial dirigidos contra Vtg de *C. carpio* (ND-2D3, Biosense Laboratories, Bergen, Norway) según se ha descrito en la sección 3.4.4

7.3.1.4 Parámetros fisicoquímicos

Se determinaron los parámetros fisicoquímicos básicos del agua superficial en muestras tomadas en ambos sitios del río Luján y en ambos sitios de referencia. Las muestras fueron colectadas y preservadas en frío hasta su procesado en el laboratorio. En este caso el análisis incluyó las determinaciones de la concentración de amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y fósforo reactivo soluble (PRS) mediante las técnicas especificadas en el capítulo 3, sección 3.5. Además, la temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad fueron medidas *in situ* por medio de electrodos de campo (capítulo 3, sección 3.5).

7.3.1.5 Análisis estadístico

Se estudió la normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos por medio del *test* de Kolmogorov-Smirnov y el de Levene. Las comparaciones entre los grupos experimentales y el control se evaluaron para cada especie mediante ANOVA ($p < 0,05$), seguida de las comparaciones múltiples por medio de la Prueba de Tukey.

7.3.2 Resultados

No se observó mortalidad en ninguno de los grupos experimentales durante los períodos de ensayo.

a- Ensayo *in situ* con *C. carpio*

No se detectaron diferencias significativas en el FC de *C. carpio* luego de 14 días de exposición *in situ*, sin embargo el IHS evidenció un incremento significativo del 15 % en los ejemplares que permanecieron en el S2 del río Luján respecto al S1 y al sitio de referencia (SR II) (Tabla 7.10).

Tabla 7.10. Índices fisiológicos de *Cyprinus carpio* luego de 14 días de exposición *in situ* en dos sitios del río Luján y el A° Durazno.

	<i>A° Durazno</i> (Sitio de referencia)	<i>río Luján</i> (Sitio experimental)	
<i>Índices fisiológicos</i>	SRII	S1	S2
Factor de Condición	1,47 ± 0,05 (11)	1,44 ± 0,04 (11)	1,46 ± 0,02 (11)
Índice hepatosomático	2,59 ± 0,06 (11)	2,71 ± 0,12 (11)	3,17 ± 0,14* (11)

Los datos se expresan como medias ± ESM, entre paréntesis se indica el número de muestras. Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA ($p < 0,05$) y comparaciones múltiples Prueba de Tukey. (*) Indica diferencias respecto al sitio de referencia.

Respecto a la actividad de las enzimas antioxidantes evaluadas no se observaron diferencias significativas en la actividad de la CAT, sin embargo se puede observar un aumento importante (3 veces más) en la actividad de la SOD de los peces que permanecieron en el río Luján tanto en S1 como en S2 respecto al sitio de referencia (Figura 7.10). Al mismo tiempo, en ambos sitios experimentales se evidenció una disminución en los niveles de TBARS (Figura 7.10). Por último, la actividad de la GST

también incrementó significativamente sólo en el S1 respecto al SR II (29 %) (Figura 7.10). Los biomarcadores moleculares evaluados se basaron en el análisis de *Western blot* de muestras de la FS de ejemplares expuestos *in situ* por medio de jaulas sumergidas. La presencia de bandas reactivas indicó la expresión de la proteína CYP1A en muestras de peces expuestos *in situ* en el río Luján tanto en S1 como en S2. El anticuerpo anti-CYP1A_r reconoció una banda proteica en el rango de peso molecular apropiado para la CYP1A de peces (55-65 kDa). De acuerdo a lo esperado, se detectó una banda en la muestra obtenida luego de la inyección intraperitoneal de 50 mg BNF/kg (control positivo), a su vez no observaron bandas en las muestras de los ejemplares que permanecieron en los arroyos de referencia (SRI y SRII) (Figura 7.11 A). Los resultados del análisis de *Western blot* de la proteína Vtg en muestras de plasma de *C. carpio* revelaron la presencia de bandas reactivas de alto peso molecular (130-170 kDa) en las muestras utilizadas como control positivo inyectadas con 17 β-estradiol, tanto carpas machos (♂E2) como juveniles (E2) y con nonilfenol (NP), así como en las que permanecieron en el río Luján (S1). No se observaron bandas reactivas en las muestras de carpa de los sitios de referencia (SRI y II) ni en las que permanecieron en el sitio S2 del río Luján (Figura 7.12 A, B y C).

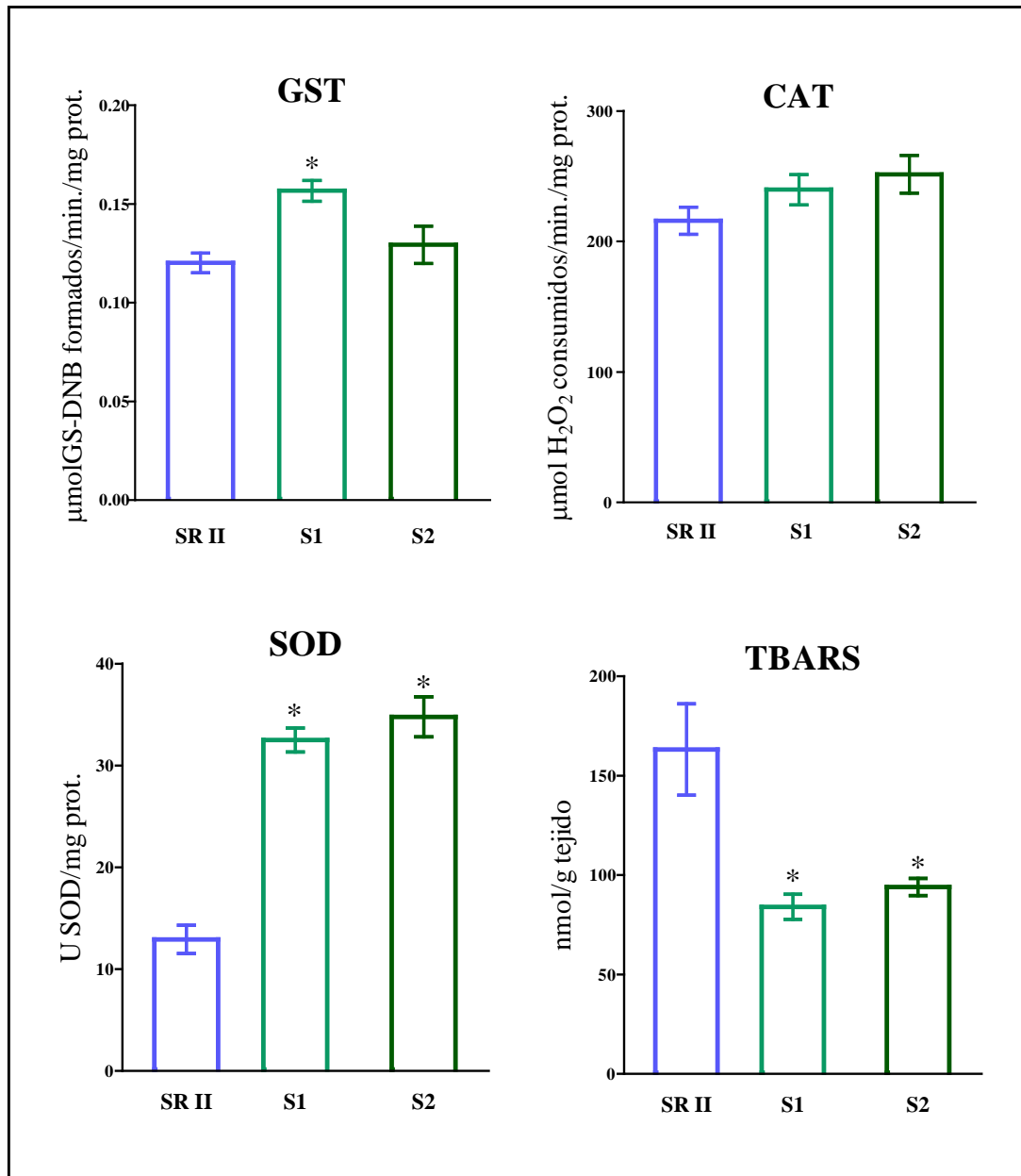


Figura 7.10. Respuestas de biomarcadores bioquímicos de *C. carpio* luego de 14 días de exposición *in situ* en dos sitios del río Luján (S1 y S2) y en un sitio de referencia, el A° Durazno (RS II). Los datos de las barras se expresan como medias \pm ESM; $n=11$ para cada grupo. Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA ($p < 0,05$) y comparaciones múltiples Prueba de Tukey. (*) Indica diferencias respecto al sitio de referencia.

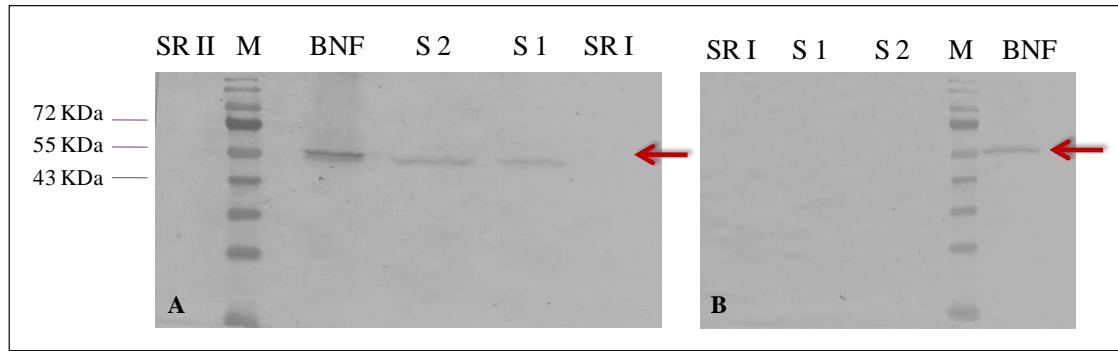


Figura 7.11. Inmunodetección por *Western blot* de la proteína CYP1A de *Cyprinus carpio* (A) y *Pimelodella laticeps* (B). Muestras de FS de los peces que permanecieron en dos sitios experimentales del río Luján (**S 1** y **S 2**) y dos sitios de referencia (arroyo Las Flores y Durazno, **SR I** y **SR II** respectivamente); **BNF**, muestra de FS 48 h después de una inyección intraperitoneal con β -naftoflavona (50 mg/Kg); **M**, marcador de peso molecular (*Page Ruler*TM. *Prestained Protein Ladder*, Fermentas).

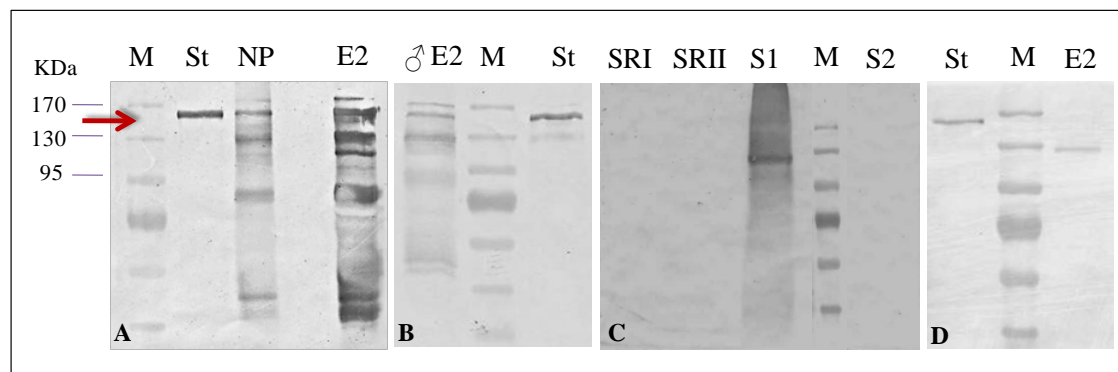


Figura 7.12. Inmunodetección por *Western blot* de la proteína Vtg de juveniles de *Cyprinus carpio* (A, B, C) y *Pimelodella laticeps* (D). Muestras de plasma de peces que permanecieron en dos sitios experimentales del río Luján (**S1** y **S2**) y dos sitios de referencia (arroyo Las Flores y Durazno, **RSI** y **RSII** respectivamente); **E2** y **♂E2**, muestra de plasma individuos juveniles y macho adulto respectivamente colectadas 72 h después de una inyección intraperitoneal con 17 β -estradiol (10 mg/Kg); **NP**, muestra de plasma colectada 72 h después de una inyección intraperitoneal con nonilfenol (100 mg/Kg); **St**, estándar de Vtg purificada de carpa (Laboratorios Biosense) (0,5 μ g) ; **M**, marcador de peso molecular (*Page Ruler*TM. *Prestained Protein Ladder*, Fermentas).

b- Ensayo in situ con P. laticeps

Luego de un período de 14 días de exposición en el río Luján se evidenciaron cambios significativos en ambos índices fisiológicos de *P. laticeps*. El FC incrementó en los peces que permanecieron en S1 respecto a SRI (8%), el IHS también incrementó tanto en los peces expuestos en S1 (41%) como en los que permanecieron en S2 (71%) respecto al sitio de referencia (Tabla 7.11).

Tabla 7.11. Índices fisiológicos de *Pimelodella laticeps* luego de 7 y 14 días de exposición *in situ* en dos sitios del río Luján (S1-S2) y el A° Las Flores (SRI).

Índices fisiológicos	7 días			14 días		
	SRI	S1	S2	SRI	S1	S2
Factor de Condición	0,71±0,01 (8)	0,76±0,02 (8)	0,70±0,02 (8)	0,69±0,01 (9)	0,75±0,01* (8)	0,66±0,01 (9)
Índice hepatosomático	1,19±0,08 (8)	1,44±0,05 (8)	1,35±0,13 (8)	1,00±0,03 (9)	1,41±0,11* (8)	1,72±0,06*† (9)

Los datos se expresan como medias ± ESM, entre paréntesis se indica el número de muestras. Las diferencias estadísticas significativas entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA ($p < 0,05$) y comparaciones múltiples Prueba de Tukey. (*) Indica diferencias significativas respecto al sitio de referencia. (†) Indica diferencias respecto al tiempo de exposición (7 días) para un mismo sitio.

Respecto a los parámetros bioquímicos, no se detectaron diferencias significativas en la actividad de SOD ni en CAT. Sin embargo, se observó un incremento significativo en la actividad de la GST de los peces que permanecieron en ambos sitios del río Luján respecto al sitio de referencia (60% S1 y 51% S2). Por último, los niveles de TBARS disminuyeron (-26% S1 y -29% S2) en relación con los de SRI (Figura 7.13). El análisis de *Western blot* de la expresión de la proteína CYP1A en *P. laticeps* reveló la presencia de bandas reactivas sólo en los peces inyectados con BNF (control positivo). Por otro lado, no se observó una señal específica correspondiente a CYP1A ni en los peces expuestos *in situ* en el río Luján (S1 y S2) ni en los que permanecieron en el sitio de referencia (RSII) (Figura 7.11 B). La

inmunodetección de la proteína Vtg de *P. laticeps* está representada por la Figura 7.12 D en la cual se puede observar una banda reactiva en la muestra de plasma de peces inyectados con 17 β -estradiol (E2). La inducción de la expresión de Vtg no fue observada en los peces inyectados con NP ni en los expuestos *in situ* en el sitio de referencia ni en los sitios experimentales (datos no mostrados).

Al evaluar un período de exposición más corto (7 días) no se observaron cambios significativos en los índices fisiológicos de los peces que permanecieron en el río Luján respecto al sitio de referencia (Tabla 7.11). Respecto a los parámetros bioquímicos sólo se evidenció cambios a nivel de la CAT, detectándose una disminución en su actividad enzimática en los peces que permanecieron en S2 respecto a SRI (-38%) (Figura 7.13). Por último, se evidenció que luego de 14 días se acentuaron las tendencias observadas en el período más corto de exposición, siendo significativas las diferencias entre tiempos de exposición para un mismo sitio. En particular se observó un incremento en el IHS (27%), SOD (38%) y GST (60%) en los peces que permanecieron en S2 y del 65% en la actividad de GST de los que permanecieron en S1. Al mismo tiempo, los niveles de TBARS disminuyeron un 10% en los peces que permanecieron expuestos 14 por días en ambos sitios respecto al período de exposición más corto (Tabla 7.11 y Figura 7.13).

Parámetros fisicoquímicos

En la Tabla 7.12 se presentan las características fisicoquímicas del agua superficial del río Luján y de los sitios de referencia. En cuanto a los parámetros medidos en el campo, valores similares de temperatura y pH se registraron en ambos ensayos y podrían ser considerados dentro del rango de niveles aceptables de acuerdo con Berón (1984). Además, los valores de conductividad de ambos sitios de río Luján (S1 y S2) fueron siempre mayores que las de los sitios de referencia (SR I y SR II). Por el contrario, los niveles de oxígeno disuelto detectados en el tramo medio del río (S1 y S2) fueron inferiores a los de los dos sitios de referencia, aunque siempre superior a los niveles de referencia (Berón, 1984). Por su parte los niveles de NH_4^+ y NO_2^- fueron mayores a los registrados en los sitios de referencia y superaron las cantidades máximas permitidas (MPQ) establecidos por la Ley argentina N° 24.051 de protección de la vida

de agua dulce. Por otro lado, los valores de estos parámetros detectados en los sitios de referencia SR I y II estaban dentro de los límites permitidos por la misma ley.

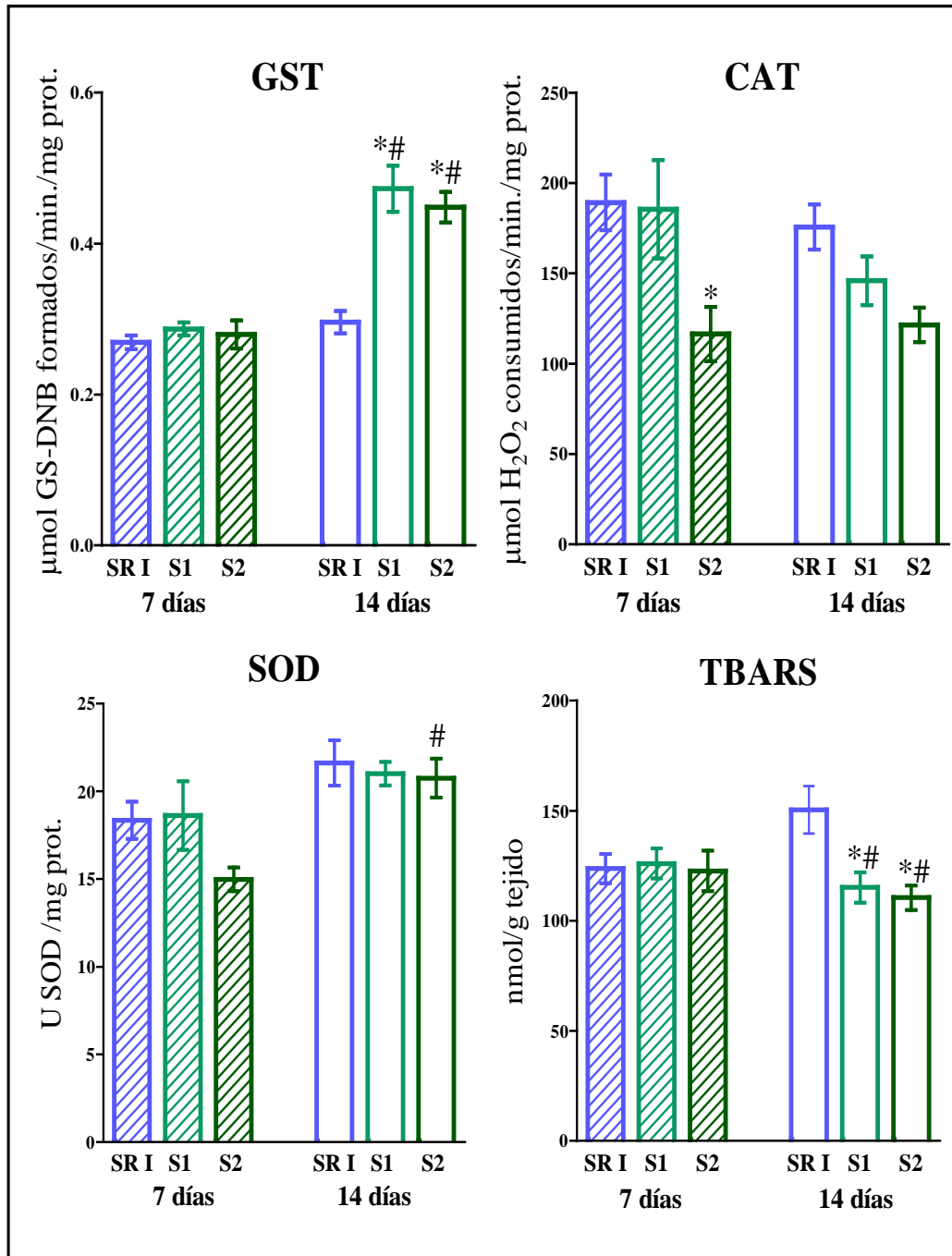


Figura 7.13. Respuestas de biomarcadores bioquímicos de *P. laticeps* luego de 7 y 14 días de exposición *in situ* en dos sitios del río Luján (S1 y S2) y en un sitio de referencia, el A° Las Flores (SR I). Los datos se expresan como medias \pm ESM; $n=9$ para cada grupo. Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA ($p < 0,05$) y comparaciones múltiples Prueba de Tukey. (*) Indica diferencias respecto al sitio de referencia para un mismo tiempo de exposición; (#) indica diferencias entre tiempos de exposición para un mismo sitio.

Tabla 7.12. Parámetros fisicoquímicos del agua superficial del río Luján y arroyos de referencia.

<i>Parámetros</i>	<i>Sitios del río Luján</i>		<i>Sitios de referencia</i>		<i>MPQ</i>
	<i>S1</i>	<i>S2</i>	<i>SR I</i>	<i>SR II</i>	
Temperatura (°C)	16 (14-28)	16 (13-21)	14 (13-24)	15 (10-27)	
pH (unidades de pH)	7,8 (7,5-8,4)	7,7 (4,6-8,4)	7,6 (6,8-8,1)	8,5 (8,3-8,6)	7,5-8,5b
Conductividad (mS/cm)	2,66 (2,4-2,75)	2,43 (2,23-2,53)	0,85 (0,67-0,95)	0,85 (0,66-1,01)	
Oxígeno disuelto (mg O ₂ /L)	5,7 (4,6-8,1)	4,5 (3,4-7,9)	6,2 (4,2-8,1)	8,5 (6,9-9,4)	> 4 b
PRS (mg/L)	0,98 (0,24-1,60)	1,04 (0,54-1,83)	0,43 (0,18-0,61)	0,14 (0,06-0,34)	
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	0,93 (0,16-2,81)	2,71 (0,52-8,00)	0,03 (0,00-0,06)	0,02 (0,00-0,07)	1,13 a
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	0,73 (0,37-1,63)	0,81 (0,03-1,36)	0,04 (0,02-0,06)	0,03 (0,01-0,06)	0,06 a

Los datos se expresan como la mediana y valores mínimos-máximos entre paréntesis. MPQ, cantidades máximas permitidas según la Ley N° 24051 (a) para la protección de la vida acuática (b) según Berón (1984).

7.5 Discusión

Actualmente existe información acerca de la presencia de distintos contaminantes orgánicos e inorgánicos en agua, sedimento y en el material particulado en suspensión así como estudios de bioacumulación de los tóxicos en diferentes tejidos de los organismos presentes en las distintas cuencas de la provincia de Buenos Aires. En particular, el estuario del Río de la Plata y la cuenca del río Luján han sido caracterizados por medio de parámetros físicos y químicos, así como niveles de metales pesados y la presencia de COPs. Sin embargo, es escasa la información biológica en estos ambientes acerca de los efectos adversos que provocan dichos contaminantes en los organismos acuáticos, incluidos los peces. Actualmente, las respuestas de

parámetros biomarcadores evaluados en peces han ganado cada vez más importancia como herramientas para la evaluación de la toxicidad en ambientes acuáticos en programas de monitoreo (Sánchez y Porcher, 2009). A pesar de este uso generalizado a nivel mundial, hasta el momento en la Argentina hay pocos estudios disponibles que reporten la calidad del medio acuático utilizando esta herramienta de evaluación por medio de ensayos *in situ*, utilizando peces confinados en jaulas (de la Torre y col., 2000; 2002; Carriquiriborde y col., 2007; Cazenave y col., 2012). A nuestro entender este es el primer informe utilizando un enfoque biológico que evalúa la calidad ambiental del Río de la Plata y el tramo medio del río Luján a través de la evaluación de las respuestas de los biomarcadores en peces confinados en jaulas y en especies nativas recolectadas en los sitios poluidos.

Estudios en la zona de Punta Lara (Río de la Plata)

La calidad de agua y sedimentos de la franja costera sur del Río de la Plata se encuentra caracterizada por diversos autores, disponiendo de información tanto de sus parámetros fisicoquímicos como los niveles de compuestos orgánicos persistentes (HAs, HAPs, PCBs, POCs, etc.) y metales pesados (FREPLATA, 2003; Colombo y col., 1990, 2005a, 2006; Barra y col., 2002). El grado de deterioro de la calidad de agua es más pronunciado en la zona sur cercano a las descargas cloacales donde fueron registrados elevados niveles de nitrógeno amoniacal (0,4-1,5 mg/L) y fosfatos (valores máximos 1,3 y 1,7 mg/L) (FREPLATA, 2003). Estos valores superan a los registrados en ambos estudios realizados con jaulas sumergidas en la zona de Punta Lara en particular dentro de las sustancias nitrogenadas, los niveles de nitrito registrados durante el 2007 fueron los más críticos superando los niveles guías. Cabe destacar que la concentración de OD en términos generales es un parámetro que no se encuentra comprometido debido a que el viento de la región permite una buena oxigenación del agua del Río de la Plata (FREPLATA, 2003); en particular la concentración registrada en nuestro estudio fue similar a la del sitio de referencia. Los niveles de HAs, HAPs, PCBs totales y metales traza en el sedimento del Río de la Plata han sido documentados anteriormente por distintos autores y son comparables con los observados en el estudio realizado en 2007 (ver Tabla 7.5). Por su parte, durante el 2010 se realizó un análisis del

sedimento tanto de Punta Lara como de los sitios de referencia, caracterizando los HAPs, PCBs y POCs (ver Tablas 7.6 a 7.8). Las concentraciones de HAPs en el sedimento del Río de la Plata muestran una alta variabilidad, por ejemplo desde 50-1500 ng/g en sedimentos más alejados de la costa afectados por el tránsito de buques y los insumos petroquímicos hasta 2500-555000 ng/g en la zonas portuarias como Buenos Aires, La Plata y Montevideo (Colombo y col, 1989; Muñiz y col, 2002; 2004). Esta misma variabilidad se vio reflejada en el sedimento luego de un derrame de petróleo en otra zona del estuario, registrándose valores entre 10-1300 ng/g p.s. para los HAPs (Colombo y col., 2005b). En particular, los niveles de HAPs registrados previamente son variables y algunos son cercanos a los valores registrados en este estudio en ambos períodos. De igual forma serían comparables con los reportados por Colombo y col. (1989) en zonas aledañas a Punta Lara y los registrados por da Silva y col. (2007) en el sedimento superficial de la bahía de Guanabara (Brasil), zona costera cercana a dos puertos comerciales, una refinería de petróleo y una zona industrial. Por su parte, existen registros de concentraciones mayores a las reportadas en este estudio en otras zonas del Río de la Plata, tanto de la costa argentina (Colombo y col., 2006) como uruguaya (Muniz y col., 2004), así como en el Río Santiago (Canal Oeste) tributario del estuario del Río de la Plata el cual recibe constantemente el vertido de residuos industriales de la mayor refinería de petróleo del país (Colombo y col., 1989). Sin embargo, el análisis de los índices de evaluación del origen de los HAPs evidenció un mayor aporte de origen petrogénico en el sedimento de Punta Lara mientras que en el sedimento de SR I y SR IV predominó el aporte de HAPs de origen pirogénico-diagénico. Algunos HAPs, presentan un origen biogénico, natural pudiendo estar presentes en minerales por ejemplo coroneno y otros como el perileno son formados por microorganismos como bacterias, algas y hongos. En particular, en el SR I se evidenció un gran aporte a los niveles de HAPs totales por parte del perileno, presentando un porcentaje mayor al 10% respecto al resto de los penta isómeros indicando un importante origen natural de este compuesto (Readman y col., 2002; Colombo y col., 2006). Por su parte, los HAPs de bajo PM (dos y tres anillos) poseen una toxicidad aguda significativa, mientras que los de mayor peso molecular suelen tener una mayor incidencia en procesos de carcinogénicos (Readman y col., 2002). En el sedimento de Punta Lara se evidenció un mayor aporte de HAPs de menor PM (origen petrogénico)

en relación a los de mayor PM (de origen pirogénico), pudiendo propiciar efectos de toxicidad de tipo aguda. Los niveles de HAs totales observados en nuestro estudio durante el 2007 son similares a los reportados anteriormente en zonas aledañas a Punta Lara por Colombo y col. (1989) así como los encontrados en la zona costera del Río de la Plata en cuatro sitios diferentes de muestreo en el puerto de Montevideo (Uruguay) (Muniz y col., 2004). Por su parte estos niveles son menores a los detectados en el Río Santiago por Colombo y col. (1989). Sin embargo, es importante mencionar que un elevado porcentaje de UCM brinda evidencias de contaminación crónica de petróleo degradado (Colombo y col., 2005b). En este trabajo el porcentaje de UCM registrado en Punta Lara es de 80 %, similar al observado en río Santiago y zonas aledañas a Punta Lara por Colombo y col. (1989). Estos autores han atribuido los valores elevados de UCM en el sedimento del Canal Oeste y Río Santiago a la cercanía al puerto de La Plata y a su actividad petroquímica, en cambio en el caso de Punta Lara y zonas aledañas, estos valores han sido atribuidos a diferentes fuentes (vertidos del puerto de La Plata, el escurrimiento de aguas pluviales, aguas residuales domésticas y el lavado de tanques de lastre). A partir de los índices de distribución de alcanos se podría inferir que si bien existe un importante aporte de hidrocarburos de vegetales terrestres se encuentran presentes también hidrocarburos petrogénicos degradados; en particular el CPI muestra que los *n*-alcanos presentes en Punta Lara provendrían principalmente del petróleo. Nuestros resultados coinciden con los reportados por Colombo y col. (1989) y Muniz y col. (2004) para el Río Santiago y el puerto de Montevideo respectivamente.

La concentración de PCBs totales encontrada en el sedimento superficial de Punta Lara durante el ensayo del 2007 excedió el valor del nivel guía de calidad de sedimentos para la protección de la vida acuática recomendado por Canadá (34,1 ng/g) (CCME, 1999-2002). Colombo y col. (2005a) han reportado concentraciones similares de PCBs totales en la misma fracción de sedimento en Punta Lara y zonas aledañas. Sin embargo, durante el 2010 se registraron valores de PCBs totales de dos órdenes de magnitud menor a los anteriormente mencionados. En cuanto a la composición de PCBs en el sedimento del Río de la Plata a lo largo de la zona costera comprendida entre la Ciudad de Buenos Aires y La Plata ha sido caracterizada por Colombo y col. (2005a) quienes determinaron la presencia mayoritaria (67%) de 13 congéneres de 3-4 a 7 átomos de cloro. Al mismo tiempo se ha detectado una importante contribución la

mezcla Aroclor 1254:1260. En el análisis realizado sobre la composición de PCBs en el sedimento y MPS en este estudio durante el 2010 se evidencia una mayor proporción de los congéneres tetra, penta y heptaclorados, si bien las concentraciones son bajas esta composición podría reflejar lo reportado anteriormente por Colombo y col. (2005a). Así mismo, en este estudio se evidenció la presencia de ciertos pesticidas organoclorados como el mirex, hexaclorociclohexanos, principalmente el isómero γ -HCH (lindano) el cual es uno de los más tóxicos y su uso ha sido prohibido por la reglamentación de nuestro país en 1968 en sanidad (Decreto 2143), en 1995 como fármaco de uso veterinario (Resolución SENASA N° 204) y más tarde como insecticida domisanitario (Disposición 7292 de ANMAT) (Ondarza, 2012) (ver Tabla 7.8). Cabe destacar, que a pesar de estas prohibiciones los niveles registrados estuvieron cercanos aunque por debajo de los niveles guía para la calidad de sedimentos para la protección de la vida acuática recomendados por Canadá (0,94 ng/g) (CCME, 1999-2002). Al mismo tiempo es importante mencionar que el tiempo de vida media del lindano es sólo de 1 a 4 semanas, quedando en evidencia el uso del mismo en zonas cercanas a Punta Lara. Por su parte, se registraron concentraciones bajas de algunos de los metabolitos del DDT aunque muy por debajo de los niveles guía de Canadá (3,54 ng/g DDD y 1,42 ng/g DDE; CCME, 1999-2002), sin embargo no se detectaron niveles de DDT en ninguno de los sitios evaluados. Otros autores han detectado la presencia de p-p' DDT en concentraciones elevadas (15,9 ng/g) en el sedimento del Canal Oeste, zona cercana a Punta Lara (Peluso, 2011), las cuales superan los niveles guía de calidad de sedimento de Canadá (NGCS: 1,19 ng/g; CCME, 1999-2002). El uso de este insecticida también ha sido prohibido en nuestro país en los '90 tanto en sanidad vegetal, salud pública como su uso domisanitario (Decreto 2121, Resolución 133, Disposición 7292 ANMAT). En este caso, cabe mencionar que la vida media de este organoclorado es de 20 a 30 años y que actualmente el DDT es impureza del acaricida Dicofol de uso permitido (Ondarza, 2012). Por su parte, la elevada concentración de PCBs y de otros compuestos organoclorados registrados en el sedimento de ciertas zonas del Río de la Plata ha sido atribuida al alto contenido de limo y arcilla así como al contenido de materia orgánica que actúan como importantes reservorios de sustancias tóxicas persistentes (ver tabla 7.5) (Colombo y col., 1990). En el estudio realizado en el 2007, el contenido de materia orgánica presente en el sedimento de Punta Lara fue comparable

con los valores reportados por Colombo y col. (1989) para zonas aledañas. Sin embargo, durante el 2010 se observó un sedimento con mayor proporción de arena y menor cantidad de materia orgánica por lo tanto esto podría explicar las concentraciones menores de los COPs registrados en Punta Lara durante este ensayo. A diferencia del ensayo anterior, durante el 2010 las jaulas permanecieron sumergidas aferradas al muelle de pescadores de la zona permaneciendo más cerca de la costa donde los sedimentos presentan una composición granulométrica diferente con una menor proporción de limo y arcilla respecto a los encontrados aguas adentro (ver Figura 7.7).

Por su parte, al evaluar el contenido de metales en sedimento, el Cr fue el único que presentó valores superiores a los valores guía de calidad de sedimentos para la protección de la biota acuática (NGCS: 37,3 $\mu\text{g/g}$) sugeridos por CCME (1999-2002). El resto de los metales se encontraron por debajo de dichos niveles. Cabe señalar que valores superiores a los registrados en este estudio han sido reportados por otros autores tanto en el Canal Oeste como en la costa de Uruguay del Río de la Plata (Puerto de Montevideo) y la bahía de Guanabara (Brasil) (Ronco y col., 2008; Muniz y col., 2004; Machado y col., 2002; Peluso, 2011).

Otro aspecto a tener en cuenta es el potencial aporte de poluentes orgánicos adsorbidos al material particulado en suspensión que representa una fracción más biodisponible para los organismos acuáticos. Estudios realizados en el Río de la Plata, en el área metropolitana de Buenos Aires (al norte de Punta Lara), evaluaron el flujo vertical de partículas totales y la acumulación de PCBs y HAPs por medio de trampas de sedimento instaladas en esta zona (Colombo y col., 2005a y 2006). Estos autores evidenciaron altos niveles de flujo de partículas totales ($361 \pm 124 \text{ g/m}^2 \text{ día}$) y tasa de sedimentación ($5,0 \pm 1,7 \text{ cm/año}$), al mismo tiempo las concentraciones de PCBs (75 ng/g) y HAPs (3,6 $\mu\text{g/g}$) en partículas en suspensión recolectadas fueron mayores que la concentración promedio en el sedimento superficial de la misma zona (Colombo y col., 2005a y 2006). En el presente trabajo, en el período de 2010 se determinaron las concentraciones de los COPs en el MPS de Punta Lara y de los sitios de referencia. Si bien los niveles totales de HAPs (2,33 ng/g), PCBs (0,33 ng/g) y POCs (0,14 ng/g) adsorbidos al MPS presente en Punta Lara fueron menores que los reportados en los estudios anteriormente mencionados, en algunos casos los niveles de ciertos congéneres

superaron a los detectados en el sedimento. Al mismo tiempo, es importante mencionar que en los sitios de referencia no se detectaron estos compuestos en el MPS o sus niveles fueron de un orden de magnitud menor que en el MPS de Punta Lara. Cabe destacar que en nuestro estudio los peces que permanecieron en jaulas en el Río de la Plata estuvieron expuestos tanto a las concentraciones de estos compuestos presentes en el sedimento superficial como también a los aportados en el material en suspensión. Al mismo tiempo, nuestros resultados evidenciaron valores de MPS en Punta Lara comparables con los reportados por Colombo y col. (2005a) y mayores al de los sitios de referencia (SR I, SR III y SR IV) (Tabla 7.4).

Los compuestos orgánicos persistentes pueden bioacumularse y ejercer efectos adversos en los organismos acuáticos siendo algunas de las vías de ingreso de los mismos la ingestión de partículas en suspensión y la dieta (biomagnificación) (van der Oost y col., 2003). En nuestro trabajo los organismos prueba utilizados evidenciaron diferentes efectos adversos promovidos por la exposición a compuestos orgánicos persistentes presentes en Punta Lara. Por su parte, Colombo y col., (2000) observaron que los niveles de contaminantes presentes en músculo de los peces capturados en el Río de la Plata están representados principalmente por compuestos orgánicos, siendo los hidrocarburos y los PCBs los más abundantes. Los compuestos hallados en mayor concentración fueron los HAs con una contribución dominante de los *n*-alcanos de menor peso molecular y los isoprenoides. En orden decreciente los siguientes compuestos encontrados fueron los PCBs y por último los metales traza. Los mismos autores sugirieron que los ejemplares de *C. carpio* recolectados de Punta Lara estuvieron alimentados con residuos orgánicos frescos probablemente derivados de la industria petroquímica y vertidos de aguas residuales. Los resultados reportados en este estudio indicarían que durante la exposición en jaulas los ejemplares de *C. carpio* estuvieron expuestos mayoritariamente a contaminantes orgánicos.

Respecto a los índices de condición en los ensayos del 2007, se observó una respuesta diferente en *C. carpio* y la especie nativa. Se evidenció un incremento en ambos índices fisiológicos en las carpas que permanecieron en jaulas sumergidas en Punta Lara. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Almoth y col. (2008b) en peces capturados de un sitio contaminado con HAPs. Estos autores sugirieron que los

peces encontrados en estos sitios podrían tener una mayor disponibilidad de alimento y esto compensaría el impacto causado por la presencia de los poluentes. El IHS es un índice que comúnmente es utilizado para evaluar la condición de los peces y brinda información sobre la actividad metabólica del hígado (Bagenal y Tesch, 1978). Considerando la ganancia de peso de los peces que permanecieron en Punta Lara que se vio reflejada en el incremento del FC, el aumento en el IHS se podría atribuir a una ganancia de peso del hígado. De acuerdo con nuestros resultados, Fernandez-Jover y col. (2007) reportaron un incremento en ambos índices fisiológicos al comparar las respuestas de sitios contaminados con poluentes orgánicos respecto a lugares de referencia en trabajos de exposición en jaulas. Sin embargo, luego de la recolección de ejemplares de *L. obtusidens* en la misma zona del Río de la Plata no se observaron diferencias en el IHS aunque el FC fue significativamente menor respecto a los ejemplares recolectados del sitio de referencia (SR III). Resultados similares fueron reportados por Ozmen y col. (2006) en carpas capturadas en sitios poluidos con diferentes tipos de contaminantes incluidos los metales. Por su parte en los ensayos realizados en 2010, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los índices de condición de *C. carpio* luego de la exposición *in situ* en jaulas en Punta Lara, así como luego de la exposición a sedimento de los mismos sitios. Los mismos resultados se evidenciaron en los ejemplares de *P. lineatus* recolectados en Punta Lara respecto de los del sitio de referencia. Resultados similares fueron reportados por de la Torre y col. (2000) luego de la exposición en jaulas de *C. carpio* en un sitio contaminado del Río Reconquista.

La presencia de una variedad de HAPs y PCBs coplanares en ambientes acuáticos pueden inducir el citocromo P450 1A en peces. Al mismo tiempo, la BNF es un HAP conocido inductor de la actividad del citocromo P450 1A en diferentes especies de peces, por ejemplo en el lenguado (Hartl y col., 2007) y en la carpa (de la Torre y col., 2006). En el presente estudio, las carpas expuestas en jaulas en Punta Lara en ambos ensayos mostraron elevados niveles de la proteína CYP1A. Una respuesta similar fue evidenciada en los ejemplares de *L. obtusidens* recolectados en la misma zona de Punta Lara. Así mismo, la intensidad de la respuesta representada como la intensidad de las bandas reactivas son comparables con la respuesta en la inducción del citocromo P450 1A de los ejemplares de cada especie inyectados con BNF que

permanecieron expuestos durante 48h. Resultados similares fueron reportados tanto en estudios a campo donde se recolectaron peces de distintos sitios contaminados con poluentes como en ensayos de laboratorio con sedimentos recolectados de sitios poluidos de zonas portuarias de Irlanda. (Hartl y col., 2007; Bozcaarmutlu y col., 2009; Kilemade y col., 2009). Sin embargo, en el presente trabajo no se evidenció la inducción del citocromo P450 1A luego de la exposición al sedimento de Punta Lara en condiciones de laboratorio. Estos resultados sugieren que tanto la exposición *in situ* de *C. carpio* como la recolección de especies nativas en Punta Lara originó procesos de biotransformación de fase I mediados por la CYP1A y que los mismos podrían haber sido promovidos principalmente por la presencia de HAPs, PCBs y POCs en el área de estudio no sólo en el sedimento superficial si no también en el MPS. El incremento en la actividad de la GST en los peces ha sido reportada por diversos autores tanto en ensayos de campo por exposición a contaminantes orgánicos (Ahmad y col., 2004; Amado y col., 2006; Bozcaarmutlu y col., 2009) como en ensayos de laboratorio con diversos agentes inductores tales como los HAPs (van der Oost y col., 2003; Ascar y de la Torre, 2005; Scarcia y de la Torre, 2008). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, tanto en el ensayo con jaulas sumergidas realizado en 2007 como en el 2010 coinciden con los de Huang y col. (2007), quienes han reportado una inducción en la actividad de la GST en individuos de *C. carpio* recolectados en un sector poluido del río Yellow (China). Por su parte las especies nativas recolectadas en Punta Lara presentaron una respuesta diferente, en los ejemplares de *P. lineatus* se observó un importante incremento en la actividad de GST. Resultados similares han sido reportados por Cazenave y col. (2009) quienes evidenciaron un incremento en la actividad de esta enzima en el hígado de ejemplares de la misma especie recolectados de un sitio del río Salado en la provincia de Santa Fe el cual se encuentra en una zona urbana que recibe el impacto de la ciudad de Santo Tomé. Así mismo, Almeida y col. (2005) reportaron un importante incremento en la actividad de GST luego de una exposición de *P. lineatus* a sedimento superficial del arroyo Cambé, principal cuenca hidrográfica de la ciudad de Londrina (estado de Paraná, Brasil), sugiriendo la presencia de contaminantes orgánicos en los sitios evaluados. Sin embargo, en *L. obtusidens* no se observaron cambios en la actividad de GST; esta respuesta también ha sido informada por Almroth y col. (2008b) en peces recogidos de sitios afectados por HAPs.

Los organismos aeróbicos, entre ellos los peces, han desarrollado un sistema de defensa antioxidante para afrontar el potencial efecto deletéreo de las EROs producidas durante la respiración aeróbica y como consecuencia de la exposición a xenobióticos (Livingstone, 2001). Dentro de las defensas antioxidantes enzimáticas la actividad de la CAT y SOD puede ser alterada por la exposición a poluentes ambientales como un mecanismo de defensa que actúa limitando el daño oxidativo (Pandey y col., 2003; Avci y col., 2005; Stanic y col., 2006; Monserrat y col., 2007). Nuestros resultados indicaron que la exposición *in situ* de ejemplares de *C. carpio* en Punta Lara provocó una respuesta antioxidante a nivel hepático de las enzimas estudiadas principalmente en la actividad de la CAT en el 2007 y de la SOD en el 2010. Resultados similares fueron reportados por Ferreira y col. (2005) quienes han detectado que la mayor contribución para evitar el daño oxidativo estuvo representada por el incremento en la actividad tanto de la CAT como de la SOD. Al mismo tiempo, la exposición de *C. carpio* a sedimento de Punta Lara en condiciones de laboratorio promovió el incremento en la actividad de ambas enzimas antioxidantes. Por su parte, luego de la recolección de ejemplares de especies nativas en la misma zona del Río de la Plata se observó que las enzimas antioxidantes evaluadas tuvieron una respuesta diferencial. Se evidenció un incremento significativo en ambas enzimas antioxidantes en los ejemplares de *P. lineatus* recolectados en Punta Lara principalmente a nivel de la CAT, mientras que en los juveniles de *L. obtusidens* se observó un aumento significativo en la actividad de SOD y una disminución en la actividad de CAT. En este contexto varios de los poluentes que han sido reportados en la zona de Punta Lara, tales como HAPs (benzo(a)pireno, 3-metilcolantreno), hidrocarburos halogenados (HAs, PCBs, dioxinas), POCs y metales (Cd, Cu, Fe) fueron indicados por Di Giulio y Meyer (2008) como potenciales generadores de EROs. Por lo tanto, la actividad de ambas enzimas podría verse alterada por la exposición a este tipo de poluentes ambientales. La exposición de *C. carpio* durante 21 días en Punta Lara durante el 2007 no promovió cambios en los niveles hepáticos de MDA evaluados mediante TBARS. Resultados similares fueron reportados por Almroth y col. (2005) en ejemplares de *Zoarcetes viviparus* recolectados de un área afectada por el dragado y derrames de petróleo (sitio crónicamente poluído). Sin embargo los mismos autores mencionan haber encontrado elevados niveles de TBARS en el mismo sitio en otra especie (datos no publicados). Al mismo tiempo, Avci y col.

(2005) tampoco encontraron diferencias significativas entre los niveles de MDA evaluados en hígado de *Silurus glanis* al comparar ejemplares recolectados aguas arriba y abajo de una refinera de petróleo. Para *C. carpio* existen reportes de incremento en los niveles de TBARS a nivel hepático en ejemplares recolectados de un sitio con contaminación urbano-industrial (Falfushynska y Stolyar, 2009), así como en ensayos de laboratorio realizados con hexachlorobenceno, HCB (Song y col., 2006). Estos resultados coinciden con los observados en nuestro estudio en el 2010, donde se evidenció un incremento en los niveles de TBARS en las carpas que permanecieron en Punta Lara. Este incremento puede ser atribuido a la ineficiencia del sistema de defensa antioxidante (enzimático y no enzimático) para prevenir el daño oxidativo a nivel de lípidos. Si bien durante el 2010, se registró un incremento en los niveles de las enzimas antioxidantes, el mismo no fue suficiente para impedir el daño a nivel de lípidos. Por el contrario, tanto durante la exposición *in situ* en el 2007 como la exposición a sedimento en condiciones de laboratorio, los niveles similares de MDA presentes en las carpas de ambos ensayos podrían estar manifestando la ausencia de daño oxidativo a nivel de lípidos. Esto último podría estar relacionado con el incremento sostenido en la actividad de las defensas antioxidantes (CAT y SOD) que evidenciaron las carpas, durante el periodo de exposición en jaulas en Punta Lara. Cabe destacar que el MDA no es un producto de LPO metabólicamente inerte ya que se sabe que varias aldehído dehidrogenasas son capaces de convertir tanto el MDA como otros productos de LPO aldehídos en sus correspondientes alcoholes (Halliwell y Gutteridge, 1999; Hermes-Lima, 2004); de esta forma se podría subestimar los niveles de MDA en los peces que permanecieron en Punta Lara. Por último, los poluentes presentes en Punta Lara promovieron daño oxidativo a nivel de lípidos en los ejemplares de ambas especies nativas recolectadas el cual no pudo ser contrarrestado por las defensas antioxidantes celulares. En este estudio, la actividad de la SOD en las bogas y la actividad de CAT en los sábalos que se encontraban bajo las condiciones ambientales de Punta Lara demostraron tener un papel importante tratando de evitar una situación de estrés oxidativo, sin embargo los niveles hepáticos de TBARS aumentados podían indicar que una condición de estrés oxidativo todavía estaba presente en estos peces.

Con el objeto de evaluar y discriminar la incidencia de las respuestas de los diferentes parámetros biomarcadores respecto a las condiciones experimentales

ensayadas se utilizó el análisis discriminante. Este tipo de enfoque integrado por análisis multivariado (análisis discriminante, análisis de componentes principales, análisis de clusters) ha sido llevado a cabo por diversos autores permitiéndoles diferenciar distintos sitios de muestreo con diferentes tipos de impacto en base a las respuestas de biomarcadores en peces recolectados (Cazenave y col., 2009; Falfushynska y Stolyar, 2009; Souza y col., 2013). En base a nuestros resultados se observa que para explicar las diferencias entre condiciones experimentales es suficiente incorporar en el análisis 4 de los 6 parámetros biomarcadores analizados con los cuales quedaría explicada el 99% de la variabilidad. Este análisis integrado permitió discriminar de forma significativa entre tipos de exposición y sitios experimentales. Así mismo, el análisis discriminante evidenció que los ejemplares de *C. carpio* que permanecieron expuestos tanto al sedimento como *in situ* en Punta Lara exhibieron una respuesta distintiva respecto a los expuestos en el sitio de referencia (SR I) y ciertos biomarcadores (SOD, TBARS, IHS) contribuyeron de forma significativa a discriminar entre ambos sitios de estudio. De esta manera, por extensión, al considerar una futura evaluación ecotoxicológica de un cuerpo de agua afectado por COPs se podrían tener en cuenta las respuestas de estos parámetros biomarcadores.

Finalmente, el tiempo de exposición en jaulas sumergidas ensayado y los niveles de COPs detectados en Punta Lara fueron suficientes para inducir cambios en los parámetros biomarcadores evaluados en ambos ensayos (2007 y 2010), indicando un deterioro del estado de salud de los organismos prueba. En particular se evidenció en los juveniles de *C. carpio* una importante respuesta a nivel hepático mediada por procesos de biotransformación ejercidos por la CYP1A y la GST así como por un incremento de la actividad de dos enzimas antioxidantes CAT y SOD. Al mismo tiempo, los ejemplares de *L. obtusidens* evidenciaron una importante respuesta antioxidante mediada principalmente por la SOD, la cual no fue suficiente para prevenir el daño oxidativo a nivel de lípidos. Por su parte, los poluentes presentes en Punta Lara promovieron en *P. lineatus* respuestas en los biomarcadores hepáticos evaluados principalmente a nivel de procesos de biotransformación de fase II (GST) y a nivel de respuestas antioxidantes principalmente por la CAT aunque ésta no fue suficiente para evitar la LPO.

Estudios en el tramo medio del río Luján

Hasta el momento uno de los reportes de monitoreo de calidad de agua y sedimento de la cuenca del río Luján más completo fue realizado en el período 2004-2005 por el Instituto Nacional del Agua (AABA). Este reporte evidenció un importante impacto antropogénico en varios sitios del río, dado principalmente por la presencia de concentraciones elevadas de metales pesados, poluentes orgánicos y bacterias coliformes. En particular en el curso medio del río, en la zona cercana al puente Las Tropas localizado aguas arriba y cercano al sitio de muestreo S1 se ha reportado la presencia de sustancias fenólicas (1,0 - 31 $\mu\text{g/L}$), mientras que en el sitio denominado Ruta 6 (R6) el cual se encuentra aguas abajo de S2 predominaron los hidrocarburos totales (0,3-1,2 mg/L) (AABA, 2010). En ambos casos los valores reportados superaron las cantidades máximas permitidas (1,0 $\mu\text{g/L}$ y 0,3 mg/L respectivamente) según la Ley nacional para la protección de la vida acuática y uso recreacional. Además, ciertas sustancias fenólicas fueron detectadas previamente durante el año 2003, la presencia de p-nonilfenol, 2-cloro-5-metil-4-metil fenol y fenol han sido informadas por Di Marzio y col. (2005) en aguas superficiales de las zonas cercanas al sitio S1 y a la descarga de la PTEL municipal. En el presente estudio, la carga de nutrientes que se registró en los dos sitios de muestreo del río Luján evidenció un aumento en las concentraciones de NH_4^+ y NO_2^- alrededor de dos y diez veces mayor que los valores de MPQ respectivamente. Resultados similares han sido reportados por Ossana y Salibián (2013) en dos sitios cercanos a la R6 aguas arriba y abajo de la descarga de un efluente permanente doméstico e industrial, ambos se encuentran aguas abajo de S2. Estos autores también han reportado la presencia de ciertos metales pesados en concentraciones elevadas, los cuales son altamente tóxicos para la vida acuática (Zn, Mn y Cr). Así mismo han desarrollado un índice de calidad de agua para este sector del tramo medio indicando un importante deterioro de la calidad del agua en la zona, el cual se correlacionó negativa y significativamente con la frecuencia de micronúcleos en muestras de sangre de larvas de rana toro (*Lithobates catesbeianus*) expuestas al agua superficial del río Luján, evidenciando su efecto genotóxico. Por su parte, los niveles de los parámetros de calidad del agua evaluados en los sitios de referencia (SR I y SR II) son, en general, aceptables teniendo en cuenta los criterios establecidos por la legislación nacional para la protección de la vida de agua dulce (Tabla 7.12). Cabe mencionar que el caudal

medio del río Luján es de 5,37 m³/s, y que el río tiene una fluctuación estacional, con valores más altos en primavera y otoño (Sánchez Caro, 2010). Por lo tanto, el impacto negativo del efluente de la PTEL municipal (media de flujo de 0,13 m³/s) sobre la calidad del agua del río se encontraba modulado por el caudal del río durante el período de ensayo.

El presente estudio, es un enfoque biológico original que evalúa por primera vez la calidad del agua del tramo medio del río Luján utilizando ensayos *in situ* con peces en jaulas sumergidas. Respecto a los índices fisiológicos evaluados, no se observaron diferencias significativas en el FC de *C. carpio* luego de la exposición en ninguno de los sitios experimentales. Estos resultados coinciden con los observados en Punta Lara durante el 2010 y con un ensayo previo llevado a cabo con la misma especie en jaulas sumergidas en otro río periurbano de la provincia de Bs. As. (Río Reconquista) en el cual no se observó una relación entre el FC y la polución de dicho cuerpo de agua (de la Torre y col., 2000). Sin embargo, la exposición de *P. laticeps* en el río Luján (S1) evidenció luego de 14 días un incremento en el FC respecto al sitio S2 y a SR I. Un incremento en este parámetro ha sido reportado por Smolders y col. (2004) luego de la exposición de carpas en jaulas sumergidas en un sitio que recibe el impacto de efluentes industriales y de una planta de tratamiento de aguas residuales. El IHS se vio incrementado en ambas especies expuestas en jaulas sumergidas en el río Luján, siendo estas diferencias más evidentes para *C. carpio*. Aunque varios factores ambientales pueden modificar este índice en los peces, el mismo fue incrementado en *C. carpio* luego de la exposición en jaulas en un estudio realizado en un sitio poluído de Bélgica cuando se compara con la situación inicial (Bervoets y col., 2009).

Respecto a los biomarcadores bioquímicos, la exposición *in situ* de *C. carpio* durante 14 días en ambos sitios del río Luján promovió cambios en el sistema de defensas antioxidantes mediado por el incremento en la actividad de la SOD, mientras que CAT no mostró cambios significativos. La inducción simultanea de ambas enzimas es comúnmente observada luego de la exposición a diversos poluentes (Hermes Lima, 2004). Sin embargo, otros autores han informado resultados similares a los observados en este trabajo donde sólo se observó un incremento en la actividad de SOD en sitios contaminados (Pandey y col., 2003; Huang y col., 2007). En coincidencia con nuestros

resultados, Camargo y Martínez (2006) no detectaron cambios en la actividad hepática de la CAT luego de la exposición de peces en jaulas en un arroyo urbano en el sur de Brasil. Por su parte, la exposición *in situ* de *P. laticeps* durante 14 días en los mismos sitios del río Luján no evidenció cambios a nivel de las enzimas antioxidantes. De acuerdo con nuestros resultados, Simonato y col. (2008) tampoco detectaron una respuesta antioxidante en CAT y SOD, sin embargo observaron una inducción de la GST luego de 15 días de exposición de *P. lineatus* a la fracción soluble del petróleo en ensayos realizados en condiciones de laboratorio. Como se mencionó anteriormente, el sistema enzimático más importante responsable de los procesos de oxidación en la fase I de la biotransformación es el sistema de monooxigenasas del citocromo P450. Hartl y col. (2007) entre otros autores reportaron para diferentes especies la inducción de estos mecanismos tanto en ensayos de laboratorio como de campo. Nuestros resultados detectaron la inducción de la proteína CYP1A en las carpas expuestas en ambos sitios del río Luján, evidenciando la inducción de los procesos de biotransformación de fase I. Estos resultados podrían interpretarse como una respuesta a la exposición de hidrocarburos totales presentes en el sedimento (541,0 mg/kg) reportados previamente en zonas cercanas al sitio experimental (AABA, 2010). Sin embargo en *P. laticeps* sólo se observó este tipo de inducción en los ejemplares inyectados con 50 mg/kg de BNF. La expresión de la proteína CYP1A en esta especie nativa no fue detectada en ninguno de los sitios experimentales del río Luján evaluados en este estudio. Estos resultados podrían indicar una menor sensibilidad de esta especie frente a la presencia de ciertos hidrocarburos que fueron reportados en la zona (AABA, 2010). Un aumento en la actividad de GST se ha encontrado en diversos estudios de campo con diferentes especies de peces, incluyendo ejemplares de *C. carpio* capturados en sitios contaminados (Pandey y col, 2003; Huang y col., 2007; Cazenave y col., 2009). En este estudio, se observó una mayor actividad de GST en los ejemplares de *C. carpio* que permanecieron en el río Luján (S1). Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Camargo y Martínez (2006) quienes también detectaron un aumento en la actividad de esta enzima en peces expuestos en jaulas en diferentes sitios afectados por el impacto antrópico de la agricultura, industria y descargas domiciliarias. Por su parte, la exposición en jaulas de *P. laticeps* promovió principalmente respuestas de biotrasformación de fase II. Las mismas se evidenciaron principalmente por el aumento

en la actividad de la GST de los peces que permanecieron en ambos sitios del río Luján (S1 y S2). Respuestas similares han sido observadas en otra especie nativa (*Prochilodus lineatus*) presente en ríos y arroyos poluidos de nuestro país (Cazenave y col., 2009).

La evaluación de los niveles de Vtg en plasma han sido utilizados para establecer la exposición a compuestos desorganizadores endocrinos estrogénicos tales como los alquifenoles etoxilados y sus metabolitos más persistentes (por ejemplo, NP). La exposición de distintas especies de peces a NP, NPE u otros alquifenoles en condiciones de laboratorio también ha demostrado una inducción significativa tiempo dependiente en la concentración de Vtg (Kirby y col., 2007; Genovese y col., 2011). De acuerdo con estos autores, en el presente estudio se ha detectado mediante el análisis de *Western blot* la expresión de la proteína Vtg en *C. carpio* luego de la inyección intraperitoneal de 17 β -estradiol o NP. Al mismo tiempo, estudios de campo han mostrado el incremento en los niveles de Vtg tanto en carpas recolectadas (Carballo y col., 2005; Mitchelmore y Rice, 2006) como expuestas en jaulas (Snyder y col., 2004) en diferentes sitios que reciben aportes antropogénicos, afectados por el vertido de diferentes tipos de descarga incluyendo las descargas de plantas de tratamiento. En este estudio, se evidenció una inducción en la expresión de la proteína Vtg en carpas que permanecieron en jaulas sumergidas aguas arriba de la PTEL municipal de la ciudad de Luján (S1). Esta respuesta observada en la expresión de Vtg podría atribuirse a la presencia de NP detectado en el agua superficial y en el sedimento del río Luján durante el período experimental. En este contexto, NP fue detectado en muestras de agua obtenidas en el sitio S1 (0,47 $\mu\text{g/L}$) así como en el sedimento muestreado de un sitio cercano a la PTEL (915 $\mu\text{g/kg p.s.}$) (comunicación personal, Babay). Así mismo, estos resultados concuerdan con los reportes mencionados anteriormente sobre la presencia de sustancias fenólicas en el agua superficial del río Luján en sitios cercanos a S1 (Di Marzio y col., 2005; AABA 2010). Nuestros resultados muestran que el análisis por *Western blot* es una metodología útil para detectar rápidamente la expresión de Vtg tanto en ensayos de laboratorio con inductores específicos como en ensayos *in situ* con peces expuestos en la jaulas sumergidas. Como se muestra en la Figura 7.12, se detectaron bandas reactivas correspondientes al peso molecular aparente de Vtg utilizando anticuerpos específicos, sin embargo como ha sido reportado por otros autores (Hennies y col., 2003; Kavanagh y col., 2004) también se observan bandas

proteicas de menor peso molecular. Estas bandas adicionales podrían ser interpretadas como productos de degradación ya que la Vtg es una molécula altamente inestable. Si bien se utilizó un cóctel inhibidor de proteasa (Sigma, P 2714) para inhibir la degradación de Vtg en las muestras de plasma de ambas especies, parecería probable que este inhibidor no haya sido totalmente eficaz para evitar la degradación de Vtg en presencia de estos agentes. Respecto a los resultados de Vtg obtenidos con la especie nativa solo se evidenció la presencia de una banda reactiva de alto peso molecular en muestras de plasma de ejemplares de *P. laticeps* inyectados con E2. Resultados similares fueron reportados para una especie de siluriforme africano (*Clarias gariepinus*) capturados de diferentes sitios afectados por el vertido de aguas residuales (Mdegela y col., 2010).

Varios estudios han demostrado un aumento de la LPO en diferentes especies de peces expuestos a contaminantes en ensayos de campo (Ferreira y col., 2005; Falfushynska y Stolyar, 2009). Además, Oakes y van der Kraak (2003) han reportado altos niveles de TBARS en tejido hepático de ciprínidos expuestos inmediatamente aguas abajo de la descarga del efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales municipal. En este estudio, a diferencia de lo que se ha reportado anteriormente, se observó que los niveles de TBARS fueron significativamente menores en ambas especies prueba luego de la exposición en ambos sitios del río Luján (S1 y S2).

Cuando se consideraron tiempos de ensayos más cortos (7 días), Camargo y Martínez (2006) detectaron diferencias sólo en algunos biomarcadores, incluyendo la GST, luego de exponer ejemplares de *P. lineatus* en jaulas en un río urbano contaminado. Al evaluar las respuestas de los biomarcadores de *P. laticeps* luego de un período de exposición más corto (7 días) sólo se observó una disminución en la actividad de CAT de los peces que permanecieron en S2. Al mismo tiempo, en este estudio, se evaluaron las diferencias entre los dos tiempos de exposición (7 y 14 días) y se encontró que un aumento en el tiempo de exposición promovió una respuesta mayor en IHS y en la actividad de SOD de los peces S2. Se observó la misma respuesta en la actividad de GST de los peces que permanecieron tanto en S1 como en S2. Es importante señalar que el tiempo de exposición no promovió diferencias significativas

en ninguno de los biomarcadores evaluados en los peces que permanecieron en el sitio de referencia (SR I).

El enfoque utilizado en el presente estudio de exposición *in situ* con jaulas sumergidas ha demostrado ser una herramienta valiosa para medir los efectos biológicos en diferentes momentos en los sistemas acuáticos, ya que representa un escenario más realista, que no se replica en las pruebas de toxicidad en laboratorio. van der Oost y col. (1998) evaluaron diferentes períodos de exposición (2, 4, 6, y 8 semanas) por medio de ensayos en jaula *in situ* con *C. carpio* en un sitio contaminado cerca de Amsterdam y se encontró que un tiempo de exposición de 4 semanas fue suficiente para detectar las respuestas de biomarcadores importantes en el sitio contaminado. Cabe mencionar que en el presente trabajo de tesis se requirieron de tiempos de exposición relativamente cortos para detectar los efectos adversos tanto sobre *C. carpio* como sobre *P. laticeps* luego de la exposición *in situ* con jaulas. Dichos efectos podrían ser atribuidos principalmente a la presencia de una mezcla compleja de poluentes persistentes, principalmente los orgánicos presentes en el sedimento, MPS y agua superficial de la zona costera de Punta Lara en el Río de la Plata y en el tramo medio del río Luján. Por último, podemos concluir que la evaluación de la batería de biomarcadores propuestos en juveniles de *C. carpio* y especies nativas confinados en jaulas aportaría valiosa información acerca de la calidad del agua de las zonas de estudio y su impacto en organismos residentes; a su vez, la metodología de trabajo adoptada podría ser considerada en estudios de evaluación ecotoxicológica en zonas costeras de ríos periurbanos.

CAPÍTULO 8

Evaluación de la variabilidad de los biomarcadores

8.1 Introducción

La evaluación de parámetros biomarcadores utilizados como señales tempranas de efectos adversos promovidos por compuestos de origen antrópico, tiene creciente importancia en estudios de contaminación y monitoreo del ambiente acuático. Por lo tanto es importante tener en cuenta al realizar estudios con estos parámetros que los biomarcadores son susceptibles a la variabilidad natural debido a factores abióticos (por ejemplo, temperatura, oxígeno disuelto) y factores bióticos (por ejemplo, género, edad, tamaño, etapa reproductiva) (Whyte y col., 2000; van der Oost y col., 2003). Estos factores podrían enmascarar el efecto de las señales de estrés inducidas por contaminantes y dificultar la interpretación del resultado de las respuestas de los biomarcadores. Un aspecto que puede ser tenido en cuenta es adoptar metodologías y criterios que permitan minimizar todos aquellos factores que puedan influir en la variabilidad de estos parámetros. Sin embargo, para poder implementar el uso de biomarcadores en estudios de monitoreo ambiental es importante establecer una línea de base, definir niveles de referencia que permitan caracterizar la variabilidad natural de estos parámetros lo que podría ser usado para analizar los cambios en presuntos sitios contaminados (Balk y col., 1996; Koenig y Solé, 2012). De esta forma, los valores de referencia para los diferentes parámetros biomarcadores permitirán distinguir entre la variabilidad natural (ruido) y el efecto adverso inducido por contaminantes (señal) (van der Oost y col., 2003). En el presente capítulo se pretende establecer una línea de base de los biomarcadores evaluados a partir de la respuesta de todos los ejemplares control de *C. carpio* y dos especies nativas estudiadas en el presente trabajo.

8.1.1 Hipótesis y Objetivos

Hipótesis:

Las diferentes condiciones experimentales tales como las vías de exposición y variación en la temperatura y fotoperíodo influyen en los niveles basales de los biomarcadores propuestos.

En condiciones de campo la variación de los factores ambientales a los que están expuestos los peces modulan tanto los niveles basales como las respuestas de los biomarcadores propuestos frente a un tóxico de referencia.

Objetivos:

1. Evaluar la variabilidad de los niveles basales de los biomarcadores propuestos frente a distintas vías de exposición.
2. Evaluar la incidencia de las condiciones ambientales en la respuesta de los biomarcadores luego de una exposición aguda a un HAP (β -naftoflavona).
3. Generar una línea de base de los biomarcadores propuestos para *C. carpio* y algunas especies nativas más utilizadas en el presente trabajo.

8.2 Materiales y Métodos

8.2.1 Variabilidad de los niveles basales de los biomarcadores

Con el objetivo de evaluar la variabilidad de los niveles basales de los biomarcadores se expuso a los peces a distintos medios control, los cuales representan las diferentes vías de exposición de los tóxicos utilizadas en el presente trabajo de Tesis. Este análisis se realizó con *Cyprinus carpio* y con dos de las especies nativas más utilizadas en el presente trabajo (*Corydoras paleatus* y *Pimelodella laticeps*). Se elaboró una “línea de base” de cada uno de los parámetros biomarcadores para cada tipo de exposición, la misma se determinó a partir de los resultados obtenidos de los grupos control evaluados en los distintos ensayos (de laboratorio y campo). En la Tabla 8.1 se resumen las diferentes vías de exposición ensayadas y el tratamiento que recibió cada grupo control así como el tiempo de exposición y la especie prueba utilizada en cada caso haciendo referencia al capítulo en el cual se describe detalladamente cada uno de los ensayos mencionados. Se calcularon los valores medios y los coeficientes de variación (CV) para cada parámetro según los diferentes tipos de exposición y para cada especie prueba.

Tabla 8.1. Resumen de la metodología empleada.

Vías de exposición	Tratamiento control	Tiempo de exposición	N	Especie prueba	Referencia
Inyección intraperitoneal (I.ip)	Aceite de maíz	48-72 h	30	<i>C. carpio</i>	Capítulo 4-6
			29	<i>C. paleatus</i>	
			7	<i>P. laticeps</i>	
Agua (AG)	Agua de red no clorada	15 días	10	<i>C. carpio</i>	Capítulo 4
			20	<i>P. laticeps</i>	
Sedimento (SD)	Sedimento A° Las Flores	21 días	30	<i>C. carpio</i>	Capítulo 4-6
			23	<i>C. paleatus</i>	
Ambiental-Campo (CA)	Jaula en A° Las Flores y A° Durazno	15-21 días	32	<i>C. carpio</i>	Capítulo 7, 8
			28	<i>P. laticeps</i>	
			20	<i>C. paleatus</i>	

8.2.2 Incidencia de las condiciones ambientales sobre la variabilidad de los biomarcadores

Para evaluar el efecto de las condiciones ambientales sobre la variabilidad en las respuestas de los biomarcadores, se realizaron ensayos de intoxicación inducida por medio de un HAPs modelo, la β -naftoflavona (BNF) bajo condiciones experimentales de laboratorio y campo. Los ensayos de laboratorio y campo fueron realizados en forma contemporánea en época estival e invernal y se utilizó como especie prueba ejemplares de *C. paleatus*. Para ambas condiciones, se determinaron dos grupos: control (Co) y experimentales (BNF), asignando a cada uno 10 peces al azar. Los individuos del último grupo recibieron una dosis de 50 mg BNF/kg p.c. disuelta en aceite de maíz. Dicha dosis se administró por medio de una única inyección intraperitoneal (10ml/kg p.c.). Los individuos control fueron inyectados con aceite de maíz. Tanto el grupo control como aquellos individuos inyectados con BNF se dividieron en dos subgrupos: laboratorio y campo. En el ensayo de laboratorio los peces permanecieron bajo las siguientes condiciones:

- Condiciones de Verano: fotoperíodo 16/8h D/N; Temperatura del agua $25\pm 1^{\circ}\text{C}$
($3,2 \pm 0,2$ g p.c., media \pm ESM; $n = 20$)
- Condiciones de Invierno: fotoperíodo 8/16h D/N; Temperatura del agua $15\pm 1^{\circ}\text{C}$
($7,1 \pm 0,2$ g p.c., media \pm ESM; $n = 20$)

En los ensayos de campo los peces permanecieron sumergidos en jaulas, como se describió en el Capítulo 3 (ver sección 3.2.2 a) en un sitio libre de contaminantes, el arroyo Las Flores, utilizado como sitio de referencia en el presente trabajo de Tesis (SR I). Estos ensayos fueron realizados en verano ($n=20$; $3,7 \pm 0,2$ g p.c.) e invierno ($n=20$; $6,6 \pm 0,3$ g p.c.) (media \pm ESM). Luego de 48 h los peces fueron extraídos de los acuarios o jaulas y llevados al laboratorio donde fueron procesados como se describió en el Capítulo 3, sección 3.3.

8.2.3 Análisis estadísticos

Las diferencias estadísticas entre los grupos evaluados en la sección 8.2.2 fueron determinadas por medio de ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey ($p < 0,05$) (Zar, 1996). Se calcularon los coeficientes de variación expresados en porcentaje (CV %) para cada parámetro y cada especie prueba respecto a las diferentes vías de exposición y un CV total para cada parámetro y para cada especie prueba. Para poder comparar la línea de base en las diferentes matrices de exposición, se utilizaron gráficos de caja tipo *box and whiskers plot* indicando la media, mediana, percentiles (25 y 75%), valores máximos y mínimos y los datos *outliers*, los cuales fueron establecidos a partir del análisis de Tukey como aquellos valores que distan más de 1,5 veces la distancia intercuartil o hasta el punto más alto o más bajo, lo que sea más próximo.

8.3 Resultados

8.3.1 Variabilidad de los niveles basales de los biomarcadores

En la Tabla 8.2 se presentan los coeficientes de variación de los parámetros biomarcadores para cada especie prueba seleccionada y cada vía de exposición. Este

coeficiente nos permitió comparar series de datos teniendo en cuenta no sólo la desviación estándar de los datos si no también la media de cada serie. Respecto a los parámetros biomarcadores en general, al observar el % CV total de cada parámetro, en las tres especies analizadas se evidenció una mayor variabilidad en los niveles de TBARS y en la actividad enzimática de SOD. Por el contrario, se observó una menor variabilidad en los índices fisiológicos (FC e IHS) tanto en general (% CV total) como para cada vía de exposición, esta tendencia se evidenció en todas las especies prueba analizadas. Teniendo en cuenta todos los biomarcadores determinados para cada especie y tomando como referencia un CV >21% como indicador de variabilidad del parámetro en estudio, se observó que *P. laticeps* es la especie con una menor proporción de biomarcadores variables (37% de los biomarcadores), seguida por *C. carpio* (58%) y *C. paleatus* (60%). Al analizar las diferentes vías de exposición se puede observar que para *C. carpio* la mayoría de los parámetros biomarcadores presentan un coeficiente de variación mayor en la exposición *in situ* en campo (CA) respecto al resto de las vías de exposición, mientras que en las especies nativas esta diferencia no es tan marcada. Así mismo, se observó tanto para *C. carpio* como para *P. laticeps* que la exposición en campo fue la que presentó una mayor proporción de biomarcadores variables (CV >21%) (83 y 67% respectivamente) mientras que para *C. paleatus* la exposición a sedimento en laboratorio fue la que presentó mayor proporción de biomarcadores variables (80%).

Tabla 8.2. Coeficientes de variación de los parámetros biomarcadores analizados para cada especie y vía de exposición.

Parámetro	<i>Cyprinus carpio</i>					<i>Corydoras paleatus</i>				<i>Pimelodella laticeps</i>			
	Lip (%)	AG (%)	SD (%)	CA (%)	Total (%)	Lip (%)	SD (%)	CA (%)	Total (%)	Lip (%)	AG (%)	CA (%)	Total (%)
FC	15,6	10,5	7,6	20,8	16,5	10,8	8,7	17,5	17,5	5,9	8,5	9,0	8,5
IHS	14,9	19,3	16,5	<u>27,5</u>	23,3	19,4	<u>32,6</u>	<u>29,6</u>	27,8	<u>26,4</u>	20,7	<u>24,1</u>	20,7
GST	19,9	<u>25,6</u>	18,8	<u>26,3</u>	23,7	20,7	<u>39,3</u>	<u>22,7</u>	29,4	14,9	20,1	12,5	20,1
CAT	<u>27,3</u>	<u>24,4</u>	<u>31,4</u>	<u>30,6</u>	30,9	<u>24,9</u>	<u>37,2</u>	20,2	27,1	11,9	18,7	<u>27,6</u>	18,7
SOD	<u>25,8</u>	15,5	<u>23,1</u>	<u>34,9</u>	27,1	<u>31,9</u>	<u>25,1</u>	<u>32,6</u>	32,5	--	18,8	<u>42,3</u>	18,8
TBARS	<u>29,4</u>	46,7	<u>27,6</u>	<u>30,3</u>	89,8	--	--	--	--	--	<u>25,8</u>	<u>21,9</u>	25,8

Lip: inyección intraperitoneal con aceite de maíz; **AG:** exposición en agua de red no clorada; **SD:** exposición a sedimento control, sedimento del A° Las Flores procesado para los ensayos tipo *spiked*; **CA:** exposición en campo por medio de jaulas sumergidas en el A° Las Flores; **Total:** variación general de cada parámetro biomarcador teniendo en cuenta todas las vías de exposición. Se encuentran subrayados aquellos valores de CV >21%.

En las Figuras 8.1, 8.2 y 8.3 se observaron los resultados que conforman la línea de base de cada uno de los parámetros biomarcadores para *C. carpio*, *C. paleatus* y *P. laticeps* respectivamente. Las mismas han sido representadas gráficamente mediante *box and whiskers plot*, donde están caracterizadas por los valores medios, la mediana y los percentiles (75 y 25 %), así mismo se puede estimar la dispersión de los datos por medio de la amplitud o rango a través de los valores máximos y mínimos. Por su parte los valores atípicos (“*outliers*”), que distan más de 1,5 veces la distancia del intercuartil han quedado excluidos por medio del análisis de Tukey al realizar los gráficos *box plot*. Respecto a los valores de referencia de los biomarcadores de *C. carpio*, en general se puede observar que no existen grandes diferencias entre las diferentes vías de exposición ya que si bien los valores medios no son similares en todos los parámetros, los rangos se encuentran solapados, es decir que poseen una amplitud similar excepto en los niveles de TBARS donde se evidencian diferencias entre los valores de referencia de la exposición en agua y el resto de las vías de exposición. Sin embargo, al

observar los datos que quedan representados dentro de las cajas determinadas por los percentiles 75 y 25 este solapamiento no fue tan notorio, sólo se mantuvo en algunos parámetros como el FC, GST y SOD. Por su parte, las especies nativas presentan diferencias mayores entre los niveles basales de los parámetros biomarcadores según el tipo de vía de exposición, siendo más evidente en *P. laticeps*. Esto se puede observar tanto a través de las medidas de posición central (media y mediana) como de los percentiles que incluyen otros datos característicos de cada distribución. En general, se observa que GST es el parámetro biomarcador con niveles basales con mayor similitud entre las diferentes vías de exposición en las tres especies prueba.

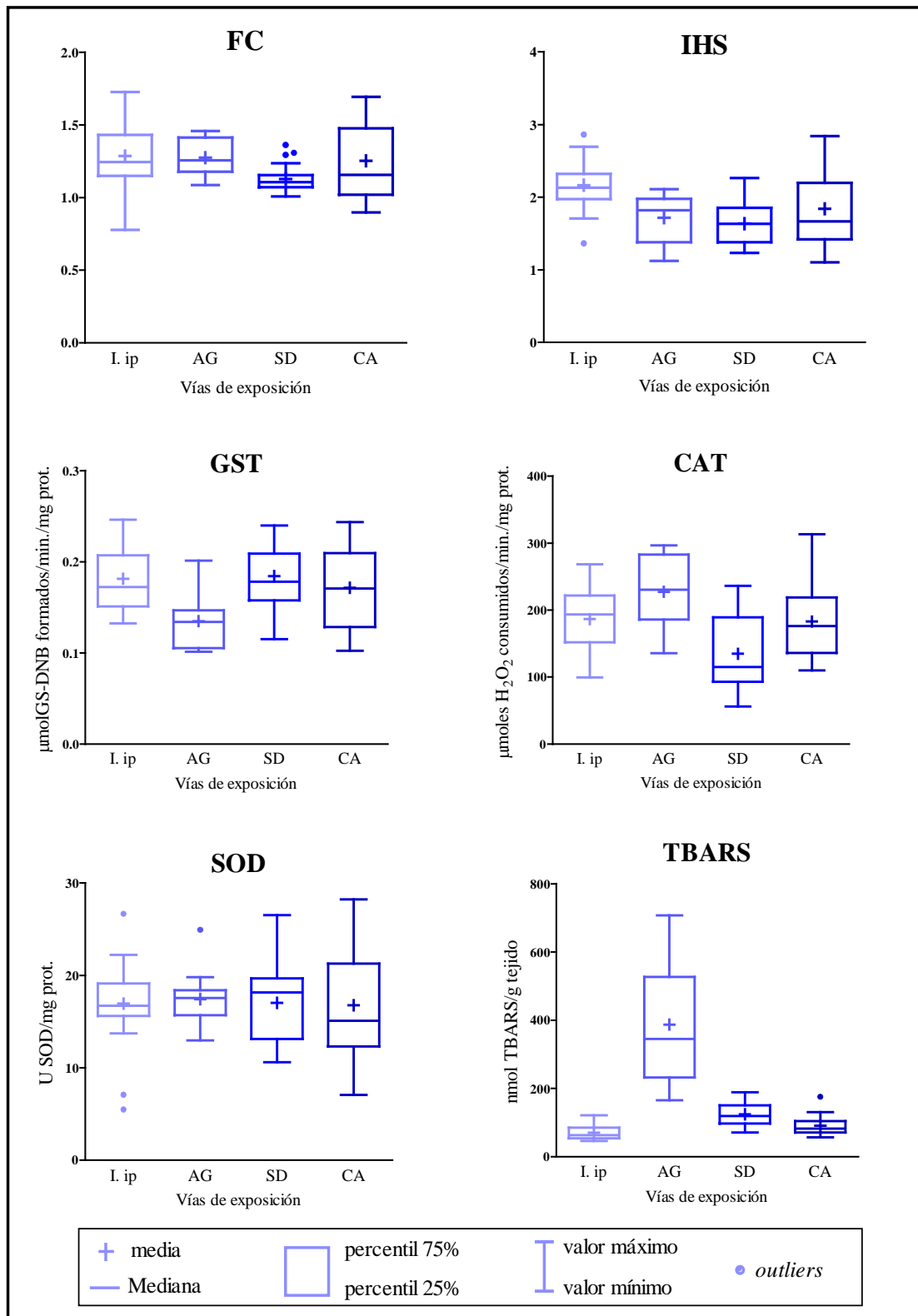


Figura 8.1. Línea de base de los parámetros biomarcadores evaluados en *C. carpio* luego de la exposición a diferentes matrices control. **I. ip:** inyección intraperitoneal; **AG:** agua; **SD:** sedimento; **CA:** campo.

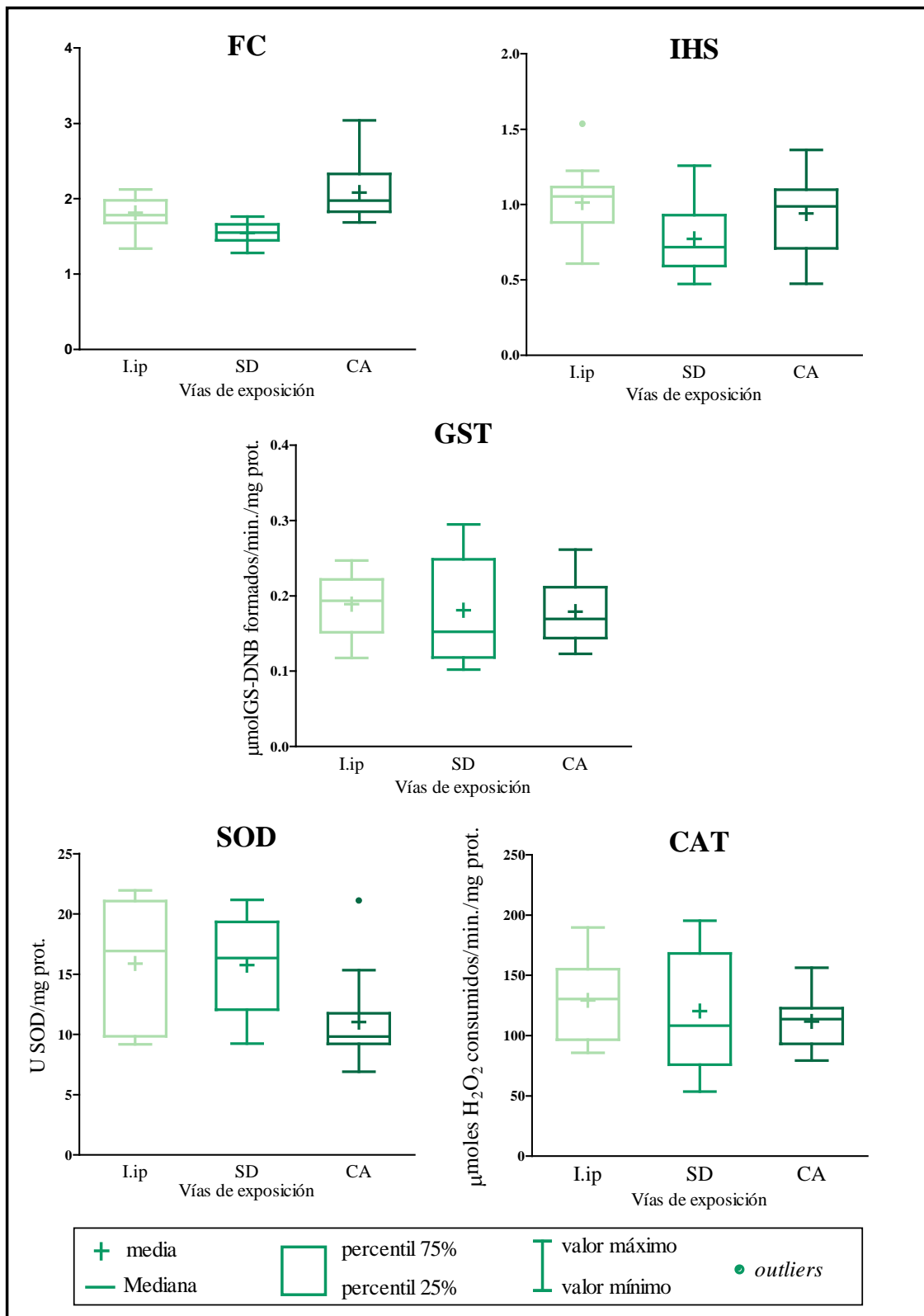


Figura 8.2. Línea de base de los parámetros biomarcadores evaluados en *C. paleatus* luego de la exposición a diferentes matrices control. **I. ip:** inyección intraperitoneal; **AG:** agua; **SD:** sedimento; **CA:** campo.

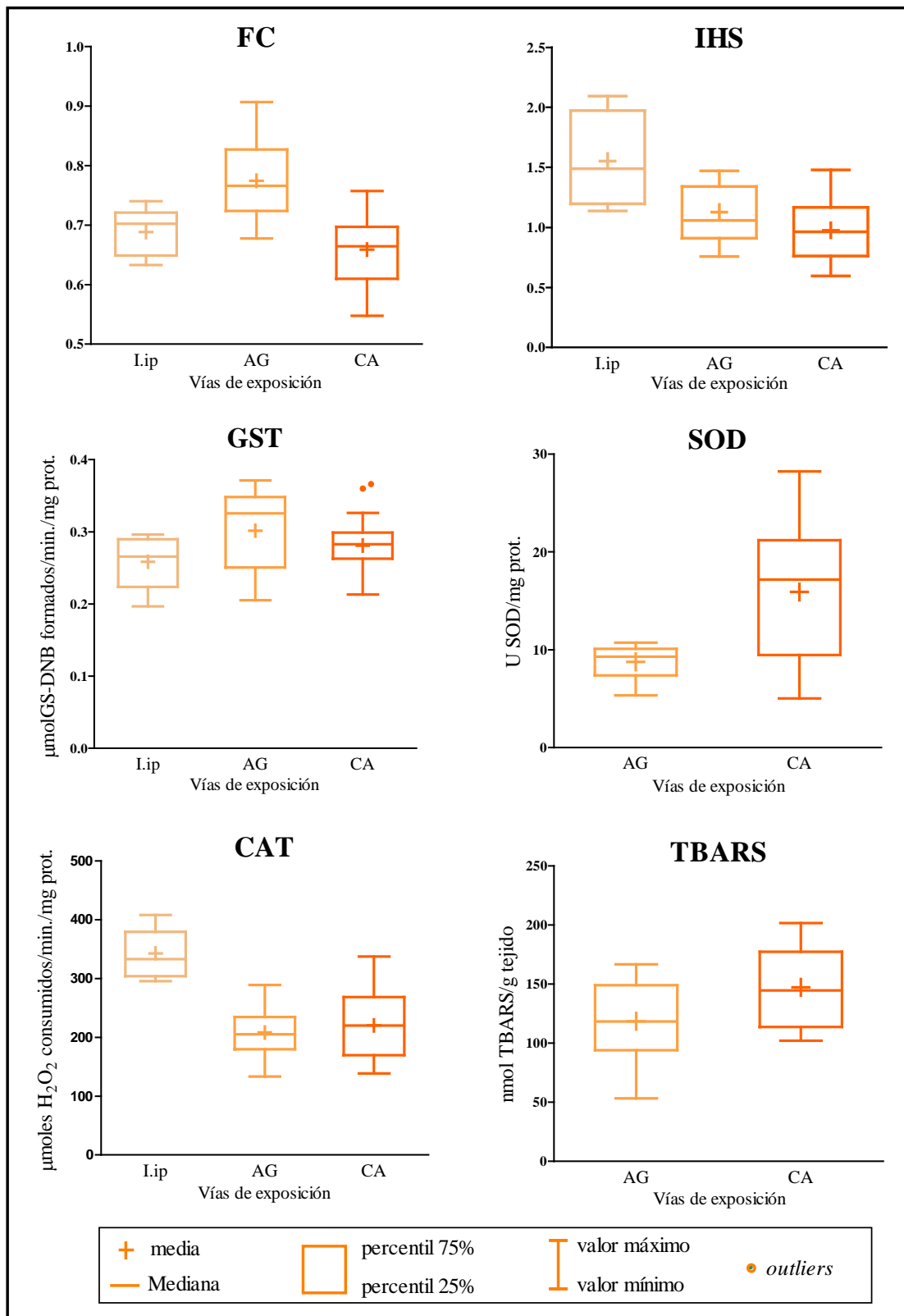


Figura 8.3. Línea de base de los parámetros biomarcadores evaluados en *P. laticeps* luego de la exposición a diferentes matrices control. **I. ip:** inyección intraperitoneal; **AG:** agua; **SD:** sedimento; **CA:** campo.

8.3.2 Incidencia de las condiciones ambientales sobre la variabilidad de los biomarcadores

Los resultados obtenidos en los ensayos donde se evaluó la variación de las respuestas de los biomarcadores fisiológicos y bioquímicos debido a las variaciones ambientales luego de la exposición aguda a BNF se indican en la Tabla 8.3 y en la Figura 8.4. Durante estos ensayos no se observó mortalidad de los individuos, confirmando que la dosis de BNF empleada fue subletal para los organismos prueba, así como a las condiciones de exposición en jaula.

No se observaron diferencias significativas en los índices fisiológicos entre los ejemplares expuestos a BNF y el control respectivo de los peces que permanecieron expuestos en jaulas y en el laboratorio durante el verano e invierno (Tabla 8.3).

Comparando los resultados de campo con los de laboratorio debe destacarse que no se detectaron diferencias significativas entre controles en ninguno de los parámetros estudiados tanto en época estival como invernal. Al mismo tiempo, el efecto de la BNF sobre la actividad de CAT como de GST en *C. paleatus* evidenció la misma tendencia de cambio tanto en los peces que permanecieron en laboratorio como los que estuvieron en jaulas sumergidas en campo. Esto no se vio reflejado en la actividad de la SOD, la cual no evidenció cambios entre peces inyectados con BNF respecto a su control en ninguno de los períodos estacionales evaluados, así como no mostró cambios entre los ejemplares que permanecieron en laboratorio y campo (Figura 8.4 A y B).

Durante el período estival se observó un incremento de 76 % en la actividad de la GST en los peces que fueron expuestos a BNF respecto a su control en los ejemplares que permanecieron en jaulas sumergidas en campo. La actividad de la CAT en este período, no mostró cambios significativos en los peces expuestos a BNF respecto a los controles ni en laboratorio ni en campo. Sin embargo, se observaron cambios significativos entre los peces inyectados con BNF que permanecieron en laboratorio y campo, siendo esta respuesta mayor en los peces bajo condiciones de verano de laboratorio (46 %).

En el período invernal se observó un incremento significativo en la actividad de GST de los peces expuestos a BNF en relación a los controles respectivos tanto en los ejemplares

expuestos bajo condiciones de laboratorio (44 %) como en los que permanecieron en el campo (32 %). Por su parte, la CAT también evidenció un incremento del 78 % en su actividad en los peces expuestos a BNF que permanecieron bajo las condiciones de campo, si bien en el laboratorio se observó la misma tendencia esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Tabla 8.3. Índices fisiológicos de *Corydoras paleatus* en condiciones experimentales de laboratorio y campo durante el período estival e invernal.

Índices fisiológicos	Período	Laboratorio		Campo	
		Control	BNF	Control	BNF
Factor de Condición	<i>Estival</i>	1,83 ± 0,11 (10)	1,97 ± 0,09 (10)	2,20 ± 0,10 (10)	2,12 ± 0,11 (10)
	<i>Invernal</i>	1,85 ± 0,05 (10)	1,82 ± 0,04 (10)	1,88 ± 0,04 (10)	1,86 ± 0,07 (10)
Índice hepatosomático	<i>Estival</i>	0,96 ± 0,06 (10)	0,75 ± 0,03 (10)	0,91 ± 0,10 (10)	0,88 ± 0,08 (10)
	<i>Invernal</i>	1,26 ± 0,07 (10)	1,16 ± 0,04 (10)	1,14 ± 0,07 (10)	1,00 ± 0,03 (10)

Los datos se expresan como medias ± ESM, entre paréntesis se indica el número de muestras. Las diferencias estadísticas significativas entre los grupos para cada uno de los períodos analizados se evaluaron mediante ANOVA ($p < 0,05$) y comparaciones múltiples Prueba de Tukey.

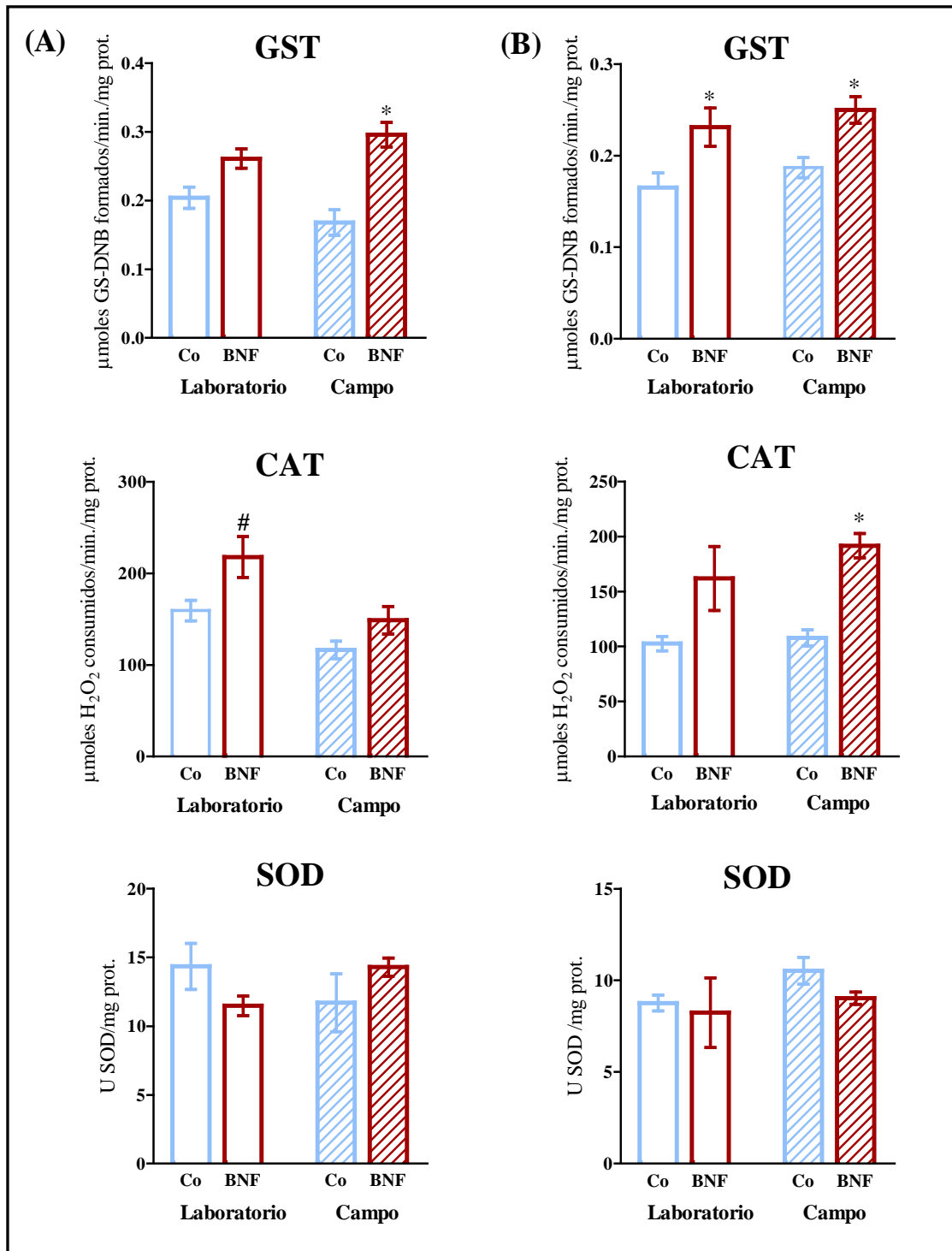


Figura 8.4. Biomarcadores bioquímicos de *C. paleatus* evaluados bajo condiciones de laboratorio y de campo durante el período estival (A) e invernal (B). **BNF**, peces inyectados con β -naftoflavona (50 mg/kg p.c.); **Co**, peces inyectados con aceite de maíz. Los datos se expresan como medias \pm ESM; $n=10$ para cada grupo. Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA ($p < 0,05$) y comparaciones múltiples Prueba de Tukey, para cada uno de los períodos. (*) Indica diferencias significativas respecto al control correspondiente, (#) indica diferencias respecto a la condición de campo.

8.4 Discusión

En este capítulo se evaluó la variabilidad de los niveles basales de los parámetros biomarcadores fisiológicos y bioquímicos, así como la incidencia de las condiciones ambientales sobre la variabilidad tanto en los niveles basales como luego de la exposición a un tóxico de referencia (BNF).

Se presentaron resultados experimentales en bioensayos de campo y de laboratorio luego de una exposición aguda de BNF sobre ejemplares de una especie nativa, *C. paleatus*. Los índices fisiológicos no evidenciaron cambios en ninguna de las condiciones ensayadas. Estos resultados concuerdan con los observados en la misma especie en condiciones estándar de laboratorio (ver capítulo 4, sección 4.3.1). Respecto a las actividades enzimáticas evaluadas, la actividad de la GST se incrementó significativamente en casi todas las condiciones experimentales, excepto en condiciones de verano en laboratorio aunque se observó una tendencia de aumento, por lo tanto se puede considerar a esta enzima con una alta capacidad biomarcadora. Resultados similares fueron reportados por Ascar (2006) en un estudio similar realizado en nuestro laboratorio con *C. carpio*. Por su parte la CAT también evidenció una tendencia de aumento en todas las condiciones experimentales, sin embargo las diferencias fueron significativas durante el período invernal en condiciones de campo. La SOD no siempre mostró el mismo patrón de respuesta y las diferencias entre BNF y controles no fueron significativas bajo ninguna de las condiciones experimentales. Al evaluar el efecto de la BNF se detectaron respuestas diferenciales entre los peces experimentales de campo y los controles en varios de los parámetros analizados principalmente durante el período invernal (Scarcia y de la Torre, 2008). Sin embargo, las respuestas de los peces fueron más evidentes en condiciones de campo. Estas diferencias podrían atribuirse a la acción conjunta de diferentes variables fisicoquímicas y biológicas presentes sólo en condiciones de campo. Por lo tanto, los ensayos a campo demostraron ser de gran utilidad ya que evidenciaron que las condiciones ambientales pueden modificar las respuestas de los biomarcadores, esto último quedó reflejado principalmente en la actividad de CAT y GST (Scarcia y de la Torre, 2008). Cabe destacar que no se observaron variaciones significativas en los niveles basales de los parámetros evaluados ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos control de laboratorio y campo. Respecto a la variación de los niveles basales reportados para *C. carpio* bajo las mismas condiciones experimentales aquí descritas, no se detectaron

modificaciones en las enzimas antioxidantes, sin embargo la respuesta de la GST se vio modulada por las condiciones ambientales en campo así como por la temperatura y fotoperíodo en condiciones de laboratorio (Ascar, 2006).

Por su parte, se elaboró una línea de base para cada uno de los parámetros biomarcadores para las diferentes vías de exposición empleadas en este trabajo tanto para *C. carpio* como para las especies nativas *C. paleatus* y *P. laticeps*. De esta forma quedó representada la variabilidad intraespecífica para cada parámetro, la cual brinda una aproximación de los niveles de respuesta esperados para cada biomarcador según las diferentes vías de exposición evaluadas. Al mismo tiempo, nuestros resultados evidenciaron la necesidad de contar con valores de referencia o líneas de base para cada especie y para cada vía de exposición. Cabe tener en cuenta que a diferencia de las especies estandarizadas, cuyos ejemplares pueden ser criados bajo condiciones controladas, los organismos nativos son usualmente obtenidos del ambiente donde están expuestos a la variabilidad natural. Así mismo, es importante considerar la variabilidad genética presente en los ejemplares de especies nativas, ya que los mismos no siempre provienen del mismo ambiente mientras que los organismos estandarizados que provienen de criadero pertenecen a lotes de ejemplares más homogéneos. Por su parte, al analizar los niveles basales de las respuestas de los biomarcadores luego de las diferentes vías de exposición se evidenció que la exposición *in situ* por medio de jaulas sumergidas fue la que presentó una mayor proporción de parámetros variables. Estos resultados podrían explicarse debido a la mayor cantidad de variables principalmente abióticas a las que están expuestos los peces en condiciones de campo, las cuales no pueden ser controladas como en los ensayos de laboratorio. Otros autores han realizado estudios de línea de base en diferentes especies nativas recolectadas de sitios con escaso impacto antrópico. En general estos estudios tienen como objetivo obtener información sobre los niveles basales de biomarcadores en peces de zonas no contaminadas para poder definir un sistema de referencia útil de ser empleado en estudios de monitoreo. Balk y col. (1996) recolectaron ejemplares de *Perca fluviatilis* a lo largo de varios años en la misma época del año, minimizando la variabilidad debido a la estacionalidad y los factores que pueden estar afectados por la misma (temperatura, período de reproducción, disponibilidad de alimento etc.) en dos posibles sitios de referencia. Estos autores evidenciaron generalmente niveles estables en los parámetros medidos tanto entre los sitios y los años, principalmente en los índices fisiológicos como el FC, IHS e índice gonadosomático, sin embargo parámetros

como la EROD presentaron una mayor variabilidad. Un resultado similar ha sido evidenciado en el presente trabajo en particular a nivel de los parámetros fisiológicos, si bien en el presente capítulo no se han analizado las respuestas de la EROD debido a que solo ha sido evaluado luego de la inyección ip y exposición a sedimento, esta tendencia se puede observar al analizar los ESM de las determinaciones de estas vías de exposición (ver capítulo 4). Por su parte, se han reportado estudios realizados en un sitio considerado de referencia evaluando las variaciones estacionales sobre las respuestas de los biomarcadores. Sanchez y col. (2008) evidenciaron que la estacionalidad y algunos factores ambientales asociados pueden influir en la variabilidad de las respuestas de ciertos biomarcadores. A modo de ejemplo, al evaluar la expresión de la Vtg, la estacionalidad influyó el estado de maduración de los individuos; de igual forma, el sexo condicionó la respuesta de la EROD. Sin embargo, observaron que ciertos parámetros asociados al estrés oxidativo (GST, GSH, TBARS, etc.) no fueron afectados por la estacionalidad en la especie *Gasterosteus aculeatus*. Nahrgang y col. (2010) reportaron que los niveles basales de los biomarcadores GST y CAT de *Boreogadus saida* del Ártico fueron levemente influenciados por la estacionalidad, mientras que no mostraron diferencias al considerar el sexo de los animales, sin embargo estos autores reportaron una fuerte variabilidad estacional en la actividad de EROD. En el presente trabajo se emplearon ejemplares juveniles de todas las especies prueba y los ensayos en campo fueron realizados en la misma estación del año de modo de minimizar las variaciones en las respuestas de los biomarcadores que pudieran estar relacionadas con el sexo de los individuos, el estadio reproductivo así como los factores determinados por la estacionalidad. Sin embargo, sería bueno contar con una línea de base de las diferentes especies prueba principalmente de las especies nativas teniendo en cuenta todos factores antes mencionados.

Por último, cabe destacar que los datos reportados en el presente capítulo brindan conocimiento sobre los niveles basales y variabilidad natural de las respuestas de los biomarcadores de *C. carpio* y dos de las especies nativas más utilizadas en el presente trabajo. Por lo tanto, los mismos podrán ser empleados como información de referencia en futuros ensayos tanto de laboratorio como de campo, permitiendo también analizar la sensibilidad de las respuestas frente a la exposición a tóxicos de referencia y al evaluar la calidad de cuerpos de agua contaminados.

CAPÍTULO 9

Discusión General y Conclusiones

Discusión General

En el presente trabajo se estudiaron las respuestas de algunos parámetros biomarcadores fisiológicos, bioquímicos y moleculares asociados a distintas etapas del proceso de biotransformación y de eliminación de los tóxicos promovidos en los organismos. Se utilizaron diferentes COPs de referencia y otros que se encuentran presentes en el ambiente acuático empleando distintas vías de exposición de los tóxicos a los organismos prueba (teleósteos dulceacuícolas). A tal fin, se realizaron ensayos de laboratorio y de campo con distintas especies prueba por medio de la recolección de especies nativas y por medio de la exposición *in situ* en jaulas sumergidas en los sitios de interés. En ambos tipos de ensayo se evaluó el efecto de los COPs sobre una especie estandarizada *C. carpio* y diferentes especies nativas frecuentadoras de fondo.

Hasta el momento en los diferentes capítulos se ha analizado y discutido el efecto que cada uno de los COPs evaluados ha tenido sobre las respuestas de los parámetros biomarcadores en las distintas especies prueba. Al mismo tiempo, se han analizado dichas respuestas luego de la exposición *in situ* por medio de jaulas sumergidas en dos ríos periurbanos (Río de la Plata-Punta Lara y río Luján-tramo medio) afectados por la contaminación antrópica con COPs. En el presente capítulo, con el objeto de sintetizar e integrar la información obtenida de los efectos de los COPs evaluados (BaP, PCBs y NP) sobre los biomarcadores de *C. carpio* se aplicó un índice de respuesta integrada (IBR, de las siglas en inglés *Integrated Biomarker Response*) para una mejor interpretación de las respuestas de los biomarcadores (ver capítulo 3, sección 3.6). Así mismo, se utilizaron gráficos de estrella (*star plot*) como una herramienta que permite representar y visualizar las respuestas de los biomarcadores luego de la exposición a los COPs en forma integrada en condiciones de laboratorio y de campo. El IBR ha sido propuesto por Beliaeff y Burgeot (2002) con el fin de resumir las respuestas de biomarcadores y simplificar su interpretación en los programas de biomonitoreo y como herramienta en la evaluación de riesgo ecológico. El IBR constituye una herramienta práctica y robusta para evaluar la susceptibilidad a diferentes contaminantes utilizando múltiples respuestas de biomarcadores. Por su parte, puede reflejar los niveles de contaminación medidos en diferentes sitios, independientemente de la variabilidad en el conjunto de biomarcadores utilizados para el cálculo del índice (Beliaeff y Bugeot, 2002; Serafim y col., 2012; Asensio y col., 2013).

En las Figuras 9.1 y 9.2 se representan los gráficos de estrella y las respuestas integradas de los biomarcadores (IBR) evaluados en condiciones de laboratorio y campo respectivamente. Se puede observar que el IBR evidencia una mayor respuesta en los ensayos de exposición por medio de una única inyección ip en comparación con los ensayos de exposición a sedimento fortificado. Así mismo, la inducción por medio de una inyección ip tuvo una respuesta mayor con el BaP mientras que la exposición a sedimento fortificado evidenció una mayor respuesta con NP. Según este índice, el rango de los tóxicos con mayor respuesta luego de ser administrados por medio de una inyección ip pueden ser ordenados como: BaP > NP > PCBs. Mientras que frente a la exposición a sedimento fortificado los mismos pueden ordenarse como: NP > BaP > PCBs (Figura 9.1). Los gráficos de estrella se utilizaron en este estudio como una posible herramienta para la visualización de efectos biológicos mediante las respuestas de los diferentes biomarcadores analizados. Por lo tanto, el gráfico de estrella de los biomarcadores evaluados luego de la administración de los tóxicos por medio de una inyección ip reveló la mayor contribución de CAT y GST al IBR luego de la exposición a BaP y NP, mientras que al IBR de la exposición a PCBs las respuestas de GST y TBARS fueron las principales. Por su parte, la exposición por medio de sedimento fortificado evidenció diferentes patrones de respuestas dependiendo del tóxico al cual estuvieron expuestos los peces. La exposición a NP reveló una mayor contribución de SOD y TBARS evidenciando un mayor daño oxidativo en *C. carpio* que la exposición al resto de los tóxicos. Mientras que la exposición a BaP evidenció una mayor respuesta a nivel de biotransformación, con un mayor aporte de GST al IBR. Por su parte, la exposición a PCBs mostró una mayor respuesta en las defensas antioxidantes, con una mayor contribución de SOD y CAT (Figura 9.1 A). En resumen, se evidenció un patrón e intensidad de respuesta en los parámetros biomarcadores dependiente del tipo de COPs y de la matriz por la que fueron expuestos a los ejemplares de *C. carpio* en condiciones de laboratorio.

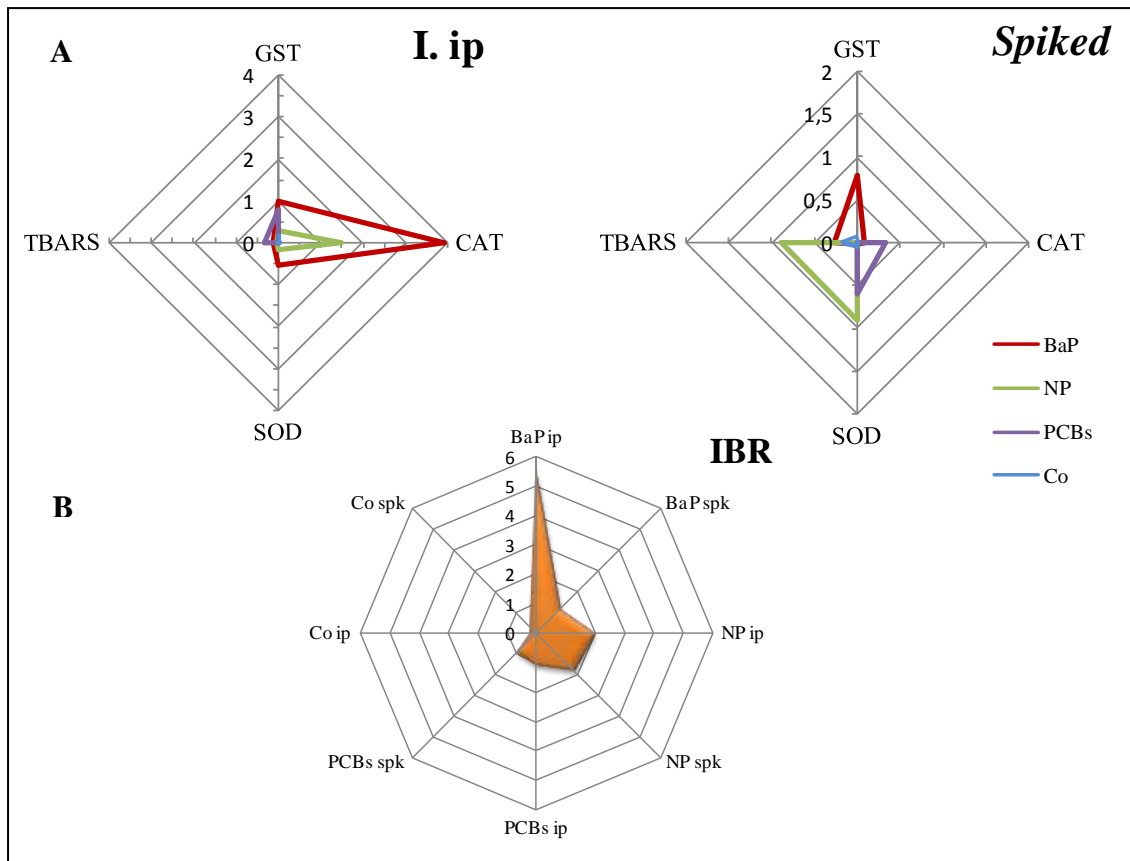


Figura 9.1. Índice de respuesta integrada (IBR) y gráficos estrella de los biomarcadores evaluados en condiciones de laboratorio. (A), gráficos de estrella de los biomarcadores evaluados luego de una única inyección intraperitoneal (I. ip) o de la exposición a sedimento fortificado (*Spiked*, spk). (B), IBR. BaP, benzo(a)pireno; NP, nonilfenol; PCBs, bifenilos policlorados; Co, control correspondiente.

La respuesta integradora de los biomarcadores evaluados en condiciones de campo evidenció valores que oscilaron entre 0,5 en los sitios de referencia (línea de base, CA) a 6,1 en Punta Lara (PL1) (Figura 9.2 B). Según este índice se puede inferir que el Río de la Plata en la zona costera de Punta Lara presenta condiciones más desfavorables que el río Luján ya que promovió una mayor respuesta integrada de los biomarcadores de *C. carpio* luego de la exposición *in situ* por medio de jaulas sumergidas. Así mismo en el río Luján se evidenció un mayor IBR en el sitio 2 (RL2) el cual se encuentra aguas abajo de la planta de tratamiento municipal de la Ciudad de Luján. Al analizar el gráfico de estrella de los biomarcadores evaluados en los distintos sitios experimentales se observa que en el Río de la Plata predominó una respuesta a nivel de biotransformación evidenciada por la actividad de GST, la cual fue más evidente en PL1, en comparación con lo observado en el río Luján donde

prevalecieron las respuestas de las enzimas antioxidantes (Figura 9.2 A). Esto último se podría vincular con la respuesta integrada de los biomarcadores observada en los ensayos de laboratorio con sedimento fortificado con BaP y NP, en los cuales predominaron respuestas a nivel de biotransformación y estrés oxidativo respectivamente. Al mismo tiempo, en Punta Lara se evidenció el efecto de inductores específicos de respuesta del sistema citocromo P450 1A, sobre la expresión de la CYP1A como por ejemplo los HAPs y en el río Luján se detectó la presencia de compuestos desorganizadores endócrinos por medio de la inducción de la expresión de la Vtg (ver capítulo 7). Sin embargo, se puede observar una diferencia en las respuestas obtenidas en los dos ensayos en el Río de la Plata, ya que en PL1 también se evidenció una importante respuesta en la actividad de la CAT mientras que en PL2 las respuestas de las enzimas antioxidantes no fueron suficientes para prevenir el daño oxidativo a nivel de lípidos, evidenciado por el notable incremento en los niveles de TBARS. Así mismo, el área del polígono es mayor en PL1 como también lo indica el IBR (Figura 9.2 B). Por su parte, en el río Luján se puede observar un patrón similar en las respuestas en ambos sitios experimentales (RL1 y RL2) evidenciado por una geometría similar en el polígono obtenido con área mayor en RL2. Así, una mayor respuesta antioxidante quedó evidenciada por la CAT y SOD en ambos sitios sin detectarse daño oxidativo a nivel de lípidos.

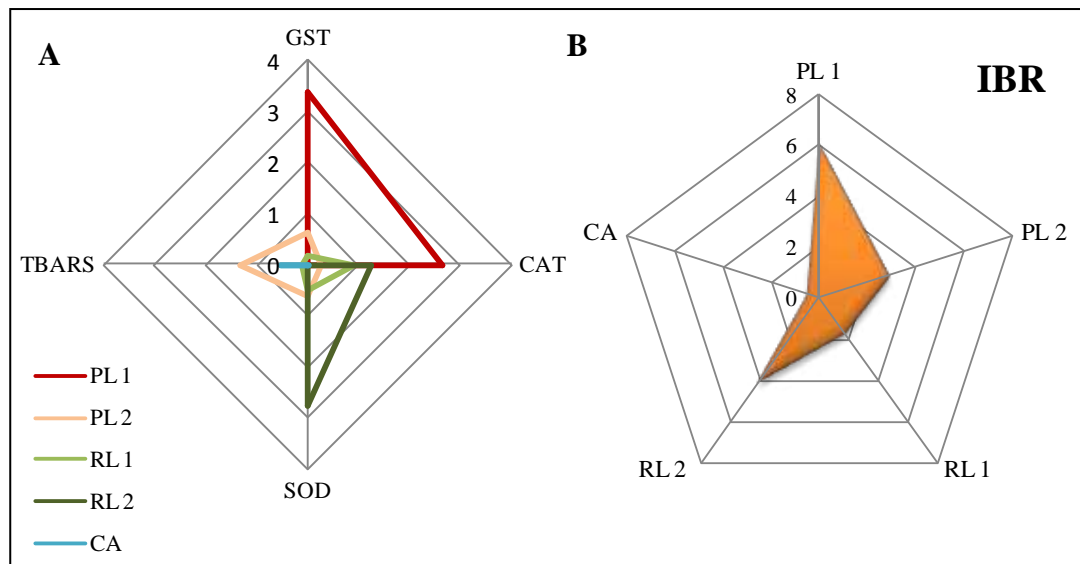


Figura 9.2 Índice de respuesta integrada (IBR) y gráfico estrella de los biomarcadores evaluados en condiciones de campo. (A), gráficos de estrella de los biomarcadores evaluados luego de la exposición *in situ* de *C. carpio* en los diferentes sitios experimentales. (B), IBR. PL1 y 2, Punta Lara período 2007 y 2010 respectivamente; RL1 y 2, río Luján sitios 1 y 2; LF 1 y 2, CA; datos de la línea de base de campo elaborada en el capítulo 8.

Por su parte, en la Figura 9.3 se representan los gráficos de estrella y las respuestas integradas de los biomarcadores (IBR) evaluados luego de la exposición *in situ* de *C. carpio* en Punta Lara y sitios de referencia y en condiciones de laboratorio luego de la exposición al sedimento de los mismos sitios. Se observó una mayor respuesta integrada en condiciones de campo respecto a la exposición en laboratorio, así como una marcada diferencia entre la exposición en Punta Lara respecto del sitio de referencia en ambas condiciones experimentales (Figura 9.3 B). Así mismo, al analizar el gráfico de estrella de los parámetros biomarcadores se observan patrones de respuesta diferentes entre la exposición en Punta Lara a campo (*in situ*) y al sedimento completo del mismo lugar en condiciones de laboratorio. En el primer caso se puede observar una mayor respuesta a nivel de biotransformación dado por la actividad enzimática de la GST así como en las defensas antioxidantes a nivel de la actividad de la CAT, siendo las respuestas de estas enzimas las que presentan un aporte mayoritario al IBR. Sin embargo, en la exposición al sedimento de Punta Lara en condiciones de laboratorio se evidencia una geometría distinta en el polígono (PL lab), donde se puede observar un mayor aporte de las respuestas de ambas enzimas antioxidantes (SOD y CAT) así como de los niveles de TBARS (Figura 9.3 A). Por lo tanto, se podría interpretar que en condiciones de laboratorio se hizo más evidente el daño oxidativo a nivel de lípidos a pesar del incremento en la actividad de las defensas antioxidantes. Estos resultados son consistentes con los obtenidos del análisis multivariado por discriminantes realizado en el capítulo 7, el cual permitió discriminar entre tipos de exposición y sitios experimentales.

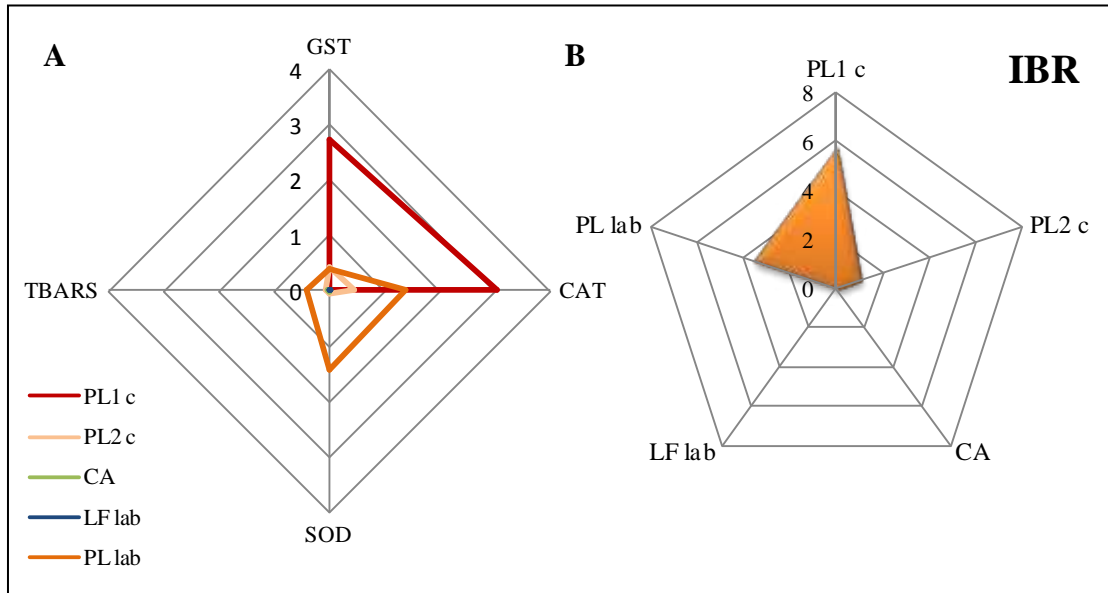


Figura 9.3 Índice de respuesta integrada (IBR) y gráficos de estrella de los biomarcadores evaluados en Punta Lara y sitios de referencia en condiciones de campo y laboratorio. (A), gráficos de estrella de los biomarcadores evaluados luego de la exposición de *C. carpio* en condiciones de campo, *in situ* y en condiciones de laboratorio, a sedimento completo de Punta Lara y el sitio de referencia. (B), IBR. PL1 c y PL2 c, Punta Lara período 2007 y 2010 respectivamente; PL lab, sedimento de Punta Lara exposición en laboratorio; LF lab, sedimento del arroyo Las Flores exposición en laboratorio y CA; datos de la línea de base de campo elaborada en el capítulo 8.

La elaboración del IBR ha sido una herramienta útil en el presente trabajo que permitió dar un enfoque integrado de las respuestas de los parámetros biomarcadores evaluados en *C. carpio* en diferentes condiciones experimentales. El uso de este tipo de índices podría ser empleado para evaluar las respuestas biológicas en estudios de monitoreo ecotoxicológico en cuerpos de agua afectados por COPs y comparar entre diferentes estaciones de muestreo, a lo largo del tiempo o incluso cuando se carece de valores de referencia (Asensio y col., 2013). Cabe destacar que los índices de este tipo son simplificaciones de las situaciones de exposición, las cuales pueden ser muy complejas principalmente en el campo, incluyendo los efectos combinados de los contaminantes, factores abióticos, así como de las múltiples respuestas fisiológicas en los organismos prueba. Por su parte, los resultados obtenidos mediante el uso de índices integrados puede servir como herramienta diagnóstica para dirigir nuevas medidas y evaluar las posibles causas de las diferencias observadas para la gestión del medio ambiente mediante la comparación de diferentes cuerpos de agua contaminados. En este trabajo el IBR permitió determinar un


mayor impacto adverso en los organismos prueba expuestos en Punta Lara respecto a los que permanecieron en el río Luján y contribuyó a generar información de base para futuros estudios en los que se contemple un monitoreo estacional y se incorporen nuevos sitios de muestreo.

El presente trabajo de tesis permitió evaluar y analizar la respuesta de una batería de biomarcadores que incluyó parámetros integrados en distintos niveles de complejidad biológica, en diferentes especies de teleósteos luego de la exposición a COPs de origen antrópico. En general se evidenció una respuesta de los parámetros biomarcadores especie dependiente y se observaron diferencias en la sensibilidad de las especies prueba. Se confirmó que *C. carpio* es una especie estandarizada adecuada para la evaluación de la toxicidad de COPs mediante el uso de biomarcadores de contaminación como punto final de evaluación. Los estudios realizados con esta especie prueba permitieron realizar un análisis integrado de las respuestas de los biomarcadores promovidas por la exposición a diferentes COPs. Así mismo, los resultados de este trabajo han demostrado la adaptabilidad las especies nativas *C. paleatus* y *P. laticeps*, como organismos prueba en ensayos de toxicidad tanto de laboratorio como de campo, agudos y prolongados en el tiempo. En particular, *P. laticeps* ha sido la especie prueba que presentó una menor proporción de biomarcadores con niveles basales variables (ver capítulo 8), mientras que *C. paleatus* demostró ser una especie sensible frente a la exposición a sedimento fortificado (ver capítulos 5 y 6). Por su parte, *L. obtusidens* y *P. lineatus* demostraron ser especies nativas susceptibles de ser empleadas en ensayos de campo mediante recolección, proporcionando información ecológicamente más relevante y complementaria con la información obtenida en ensayos *in situ*, con *C. carpio*. Por lo tanto, las respuestas de los biomarcadores de las especies nativas antes mencionadas han brindado resultados confiables y por ello se propone su utilización en estudios de evaluación ecotoxicológica de cuerpos de agua afectados por la contaminación antrópica, principalmente por COPs. A partir de la evaluación de la variabilidad de los niveles basales de los biomarcadores (capítulo 8) se evidenciaron parámetros menos variables tales como los índices fisiológicos así como elevada variabilidad en otros (por ejemplo SOD, TBARS, EROD). Sin embargo no tenemos que confundir esta mayor o menor variabilidad con la capacidad de responder frente a cambios en el ambiente como puede ser la contaminación antrópica por COPs. En base a los resultados de este trabajo se observó que tanto el IHS como el FC no evidenciaron cambios en las especies prueba frente a la exposición de los diferentes COPs en

distintas matrices bajo condiciones de laboratorio (ver capítulos 4, 5 y 6), por lo tanto no han demostrado ser biomarcadores de efecto confiables en ensayos de laboratorio. Sin embargo, en condiciones experimentales de campo se ha evidenciado su utilidad ya que se observaron cambios en estos índices tanto en ensayos *in situ* con jaulas sumergidas como luego de la recolección de especies nativas (ver capítulo 7). Así mismo, la actividad catalítica del citocromo P450 1A determinada por medio de la EROD ha demostrado ser un biomarcador sensible principalmente en respuesta a la exposición de COPs del tipo de los HAPs a pesar de la alta variabilidad evidenciada por el ESM (ver capítulo 4). En este contexto es importante contar con una línea de base para cada parámetro biomarcador y especie prueba, en particular este trabajo nos permitió conocer y tener en cuenta la variabilidad natural de cada uno y no confundirla con una posible respuesta biomarcadora. El enfoque biológico proporcionado por las respuestas de los biomarcadores evaluados en *C. carpio* y *P. laticeps* mediante ensayos *in situ* con jaulas sumergidas brindó información valiosa sobre la calidad ambiental de Punta Lara y del tramo medio del río Luján. Cabe destacar que este estudio es el primer reporte de la utilización de esta metodología en la evaluación de la calidad del agua del Río de la Plata y río Luján a través de las respuestas de parámetros biomarcadores (Scarcia y col., 2012 a y b). Así mismo, la recolección de ejemplares proporcionó información complementaria sobre el impacto de los contaminantes persistentes en los peces nativos residentes. Por lo tanto ambas metodologías pueden ser aplicables en estudios de monitoreo ecotoxicológico realizados en cuerpos de agua afectados por la contaminación antrópica.

Conclusiones

En base a los objetivos planteados y los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral se indican las conclusiones más relevantes:

-  La exposición a BaP promovió principalmente procesos de biotransformación de fase I y II mediados por el citocromo P450 (CYP1A) y GST respectivamente, así como procesos de detoxificación evidenciado por el incremento de metabolitos biliares del BaP. Este tipo de respuesta se vio intensificada en la especie nativa (*P. laticeps*) frente a la exposición en agua y en *C. carpio* frente a la exposición a sedimento fortificado.

🐟 La exposición a NP promovió principalmente en *C. carpio* el incremento en las defensas antioxidantes ejercidas por la SOD evitando un incremento del daño oxidativo de lípidos luego de un período corto de exposición, así como la expresión de Vtg.

🐟 La exposición a PCBs o mezclas de los mismos promovió mayormente una respuesta a nivel de estrés oxidativo, incrementándose tanto la actividad de las enzimas antioxidantes como el daño oxidativo a nivel de lípidos. Este tipo de respuesta se vio intensificada en la especie nativa (*C. paleatus*) y por la exposición a sedimento fortificado.

🐟 La exposición a sedimento fortificado promovió principalmente:

- con BaP, respuestas a nivel de biotransformación (fase I y II) y detoxificación en *C. carpio* y *H. littorale*, mientras que las defensas antioxidantes se vieron incrementadas sólo en *C. carpio*

- con Aroclor, daño oxidativo a nivel de lípidos en *C. carpio* y *C. paleatus*.

- con NP, respuestas a nivel de biotransformación (GST) y en las enzimas antioxidantes principalmente a nivel de SOD, aunque éstas no fueron suficientes para prevenir la peroxidación lipídica en *C. carpio* y *C. paleatus*.

🐟 La exposición de teleósteos dulceacuícolas a sedimento fortificado demostró ser una metodología de trabajo apta para evaluar los efectos adversos promovidos por los COPs sobre las respuestas de los biomarcadores como punto final de evaluación.

🐟 *C. paleatus* demostró ser una especie nativa susceptible de ser empleada como organismo prueba en ensayos con sedimento fortificado con compuestos orgánicos.

🐟 La exposición de los organismos prueba a HAs, HAPs y PCBs, en los niveles detectados en el Río de la Plata en la zona costera de Punta Lara, fueron suficientes para inducir modificaciones en las respuestas de los parámetros biomarcadores utilizados en este estudio.

🐟 El confinamiento en jaulas de teleósteos dulceacuícolas demostró ser una metodología de trabajo apta para ser utilizada en estudios de monitoreo ecotoxicológico de cuerpos de agua que sufren el impacto adverso de la actividad antrópica.

🐟 El antisuero anti-Vtg-B obtenido durante este trabajo de Tesis fue de utilidad para evaluar la exposición a sustancias estrogénicas en ensayos de laboratorio y de campo para *C. carpio*.

🐟 Se elaboró una línea de base para cada parámetro biomarcador y las diferentes vías de exposición utilizadas en el presente trabajo de tesis tanto para *C. carpio* como para las especies nativas *C. paleatus* y *P. laticeps* pudiendo ser empleada como información de referencia en futuros ensayos tanto de laboratorio como de campo.

Anexo

**Obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína
Vtg de *Cyprinus carpio***

Obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína Vtg de *Cyprinus carpio*

Con el objeto de incluir la inmunodetección de la proteína Vtg plasmática en peces como biomarcador molecular de exposición a desorganizadores endócrinos se propuso obtener un antisuero policlonal específico contra dicha proteína de *C. carpio*. Teniendo en cuenta que la región codificante de la proteína Vtg es de gran tamaño (4900 nt aprox.) se decidió amplificar por RT-PCR tres fragmentos de la región codificante de la proteína Vtg que posee las regiones con mayor homología aminoacídica a las secuencias de dicha proteína de teleósteos disponibles en el Genbank y que representan en su conjunto el 37 % de la proteína completa. En una primera etapa previa a este trabajo de tesis, se diseñaron oligonucleótidos específicos y a partir de muestras de ARN total de hígado de peces inyectados con 17 β -estradiol se amplificaron por RT-PCR los tres fragmentos (488, 734 y 625 pb de longitud) de la secuencia codificante de la proteína Vtg de *C. carpio* y se clonaron en el vector Topo (Invitrogen). La identidad de los clones recombinantes se confirmó por secuenciación, siendo idénticos a la secuencia reportada para el gen Vtg de *C. carpio*. Posteriormente, los insertos se subclonaron en el vector de expresión bacteriana pRset-B, donde la proteína de interés se expresa como fusión traduccional a un tracto de seis histidinas en su extremo amino-terminal que facilitarán su purificación mediante columnas de afinidad con níquel. En el sistema pRset/*E. coli* BL21 (DE3) pLys (Invitrogen) la expresión del gen de interés clonado en el vector pRSET es controlada por el promotor fuerte del bacteriófago T7. La cepa bacteriana porta el bacteriófago lisogénico λ DE3 Lys T7 que contiene el gen *lacI*, el gen que codifica para la ARN polimerasa del bacteriófago T7 bajo regulación del promotor *lacUV5* y una porción del gen *lacZ*. El represor *lac* reprime la expresión de la ARN polimerasa T7 pero por el agregado de IPTG se induce su expresión, la polimerasa se une al promotor y se transcribe el gen de interés. Con una colonia aislada de cada *E. coli* BL21-pRSET y de *E. coli* BL21-pRSET (como control negativo) se inocularon 5 ml de LB/antibiótico y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación. Al día siguiente se realizó una dilución 1/50 de este cultivo *starter* en 4 ml de LB/antibiótico y se creció de manera similar hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ = 0,5. La mitad de cada cultivo se indujo con IPTG y el resto se dejó como control sin inducir, ambos se incubaron a 37°C durante 2 h. Luego, se centrifugaron 1,5 ml de cada cultivo durante 2 min a velocidad máxima, se descartó el sobrenadante y el *pellet* bacteriano se resuspendió en 150 μ l de CB 2X (Tris-HCl 100 mM,

glicerol 20%, SDS 4%, DTT 200 mM, azul de bromofenol 0,2%). Para seleccionar los clones que expresaban las proteínas recombinantes, los extractos proteicos fueron resueltos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes y analizados por *Western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra el tracto de histidinas (anti-His) presentes en el extremo amino-terminal de la proteína recombinante. De esta forma, se confirmó la expresión de las tres proteínas recombinantes denominadas Vtg-A, Vtg-B y Vtg-F, que abarcan las posiciones aminoacídicas 15-165; 282-526 y 1366-1574, de la proteína Vtg de *C. carpio* y poseen un peso molecular teórico de 23,4; 32,6 y 29 kDa, respectivamente (Figura I).

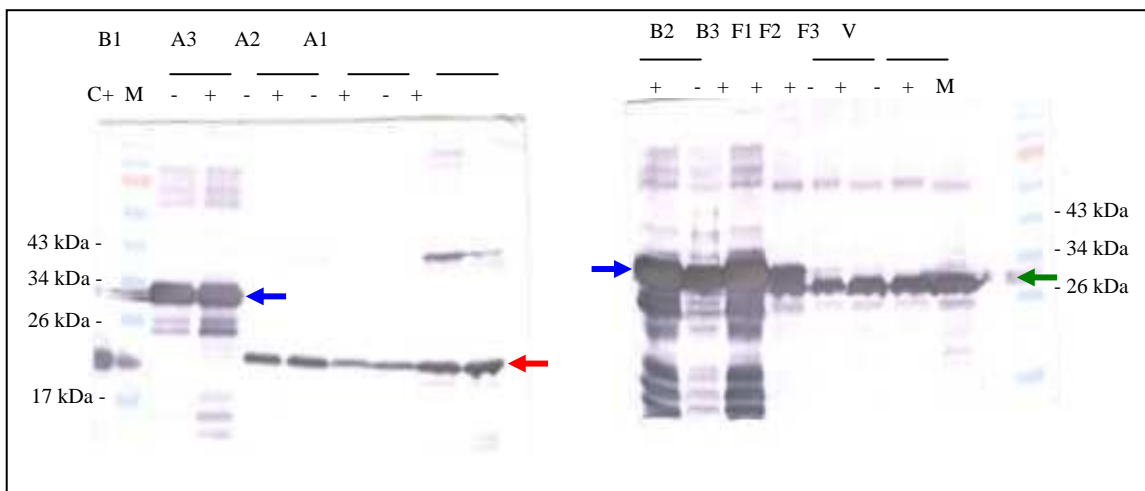


Figura I. Evaluación de la expresión de las proteínas Vtg recombinantes. Los extractos proteicos obtenidos a partir de cultivos inducidos (+) o no inducidos (-) con IPTG se resolvieron mediante PAGE 12%-SDS y se analizaron por *Western blot* utilizando el anticuerpo monoclonal anti-His (Amersham, 1:5000) como primer anticuerpo y anti ratón conjugado a la enzima fosfatasa alcalina (Sigma, 1:15000) como segundo anticuerpo. Los extractos provienen de cultivos bacterianos (clones 1 a 3) que portan los plásmidos pRSET-Vtg-A (A), pRSET-Vtg-B (B), pRSET-Vtg-F (F), pRSET (V, sin inserto), pRSET-39K (C+, porta el gen de una proteína no relacionada). M: marcador de peso molecular *Page Ruler Prestained Protein Ladder*, (Fermentas). Las bandas reactivas correspondientes a las proteínas recombinantes Vtg-A, Vtg-B y Vtg-F están indicadas por flecha de color rojo, azul y verde, respectivamente.

Teniendo en cuenta que las regiones hidrofílicas tienden a estar expuestas en las proteínas aumentando la posibilidad de inducir anticuerpos contra las mismas, para la proteína recombinante Vtg-B (de mayor tamaño y que se expresa en mayor cantidad que los otros

fragmentos) se realizó un análisis con herramientas bioinformáticas mediante el *test* de Hopp y Woods (www.jusbio.com). Como se muestra en la Figura II, el fragmento proteico seleccionado, posee regiones hidrofílicas (valores positivos de la escala), y por la ventana de seis aminoácidos en que se realizó la escala, los valores de máxima hidrofiliidad constituirían los sitios antigénicos.

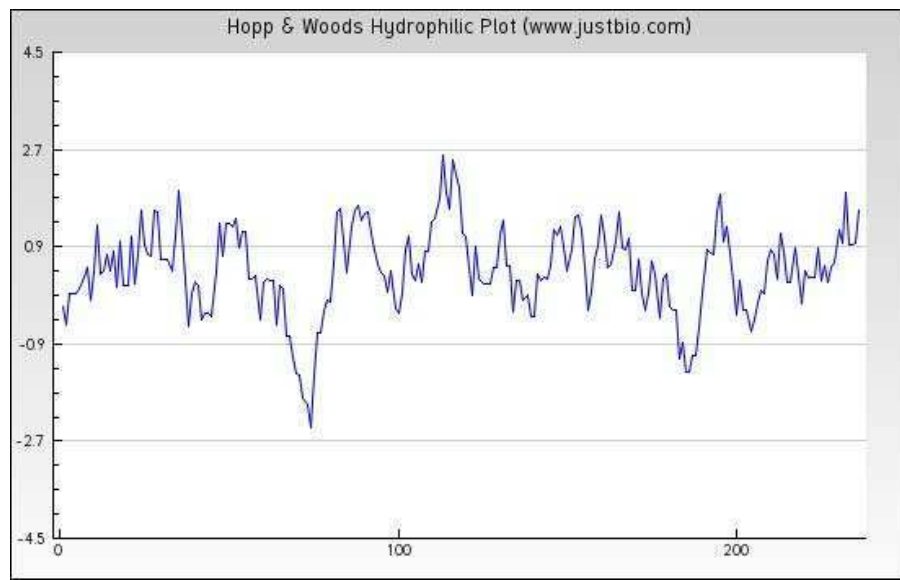


Figura II. Gráfico de hidrofiliidad. Hopp and Woods.

Además, utilizando el programa Blastp (*protein-protein* Blast, **B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool de NCBI) se determinó que el fragmento proteico Vtg-B posee una identidad (porcentaje de aminoácidos idénticos en su secuencia) del 88-95 % o del 78-80% con las proteínas Vtg de peces pertenecientes a las familias de *Cyprinidae* o *Salmonidae*, respectivamente (Figura III).

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPSSRSAAGTMEFALRGSLQYE
 FATEILQTPIQLIKISNAPVQIVEVLKHLVVNNVAMVHDDAPLKVFVQLIQLLRVSTL
 ENIEAIWTQFKNEPAYRRWILDALPAVGTPVIKFIKEKFLAGELTLPEFIQALVVAL
 QMITADLDTIQLTASLAMHEKIAKIPALREVVMLGYGSMIARHCVAVPTCSAELLR
 PIHEIAAEATSKNDIHEITLALKVLGNAGHPASLKPIMKLLPGLRTAATSLPLRVQV
 DAILALRNIKGEFEA

<i>Carassius auratus</i>	95%	<i>Coregonus lavaretus</i>	80%
<i>Pimephales promelas</i>	94%	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	79%
<i>Catla catla</i>	94%	<i>Thymallus thymallus</i>	79%
<i>Danio rerio</i>	91%	<i>Salmo trutta</i>	78%
<i>Phoxinus oxycephalus</i>	88%		

Figura III: Secuencia aminoacídica de la proteína recombinante Vtg-B y porcentaje de identidad aminoacídica con las proteínas Vtg de ciprínidos y salmónidos. Se indica la secuencia de Vtg (violeta), los aminoácidos que aporta el vector (negro) y el tracto de seis histidinas (rojo).

En base a estos resultados, en este trabajo de Tesis se purificó la proteína Vtg-B recombinante a partir de cultivos bacterianos y se obtuvo un antisuero específico dirigido contra dicha proteína.

Cinética de expresión de las proteínas recombinantes

Para determinar el tiempo óptimo de expresión de la proteína recombinante se realizó una curva de tiempo a partir de los clones seleccionados. Entonces, se creció con agitación a 37°C un cultivo de 25 ml de LB/antibiótico con una dilución 1/50 del cultivo *starter* hasta alcanzar una $D.O_{600}=0,5$. La mitad de cada cultivo se indujo con IPTG y el resto se dejó como control sin inducir. Se tomaron muestras de 1,5 ml de cultivo cada 30 min; luego de la centrifugación, considerando una tasa de replicación bacteriana de 30 min, los *pellets* se resuspendieron en CB 2X como se detalla a continuación:

Tiempo (min.)	30	60	90	120	150	180
CB 2X (μl)	43	86	129	172	216	258

La proteína recombinante se detectó desde el inicio de la inducción y la expresión aumentó a medida que transcurría el tiempo observándose un máximo a los 90 y 120 min (Figura IV).

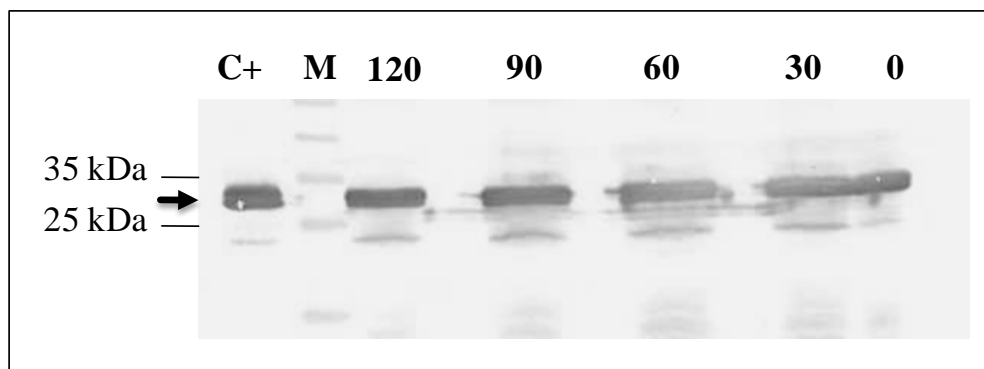


Figura IV: Expresión de Vtg-B a distintos tiempos post inducción (indicados en minutos). C+: proteína recombinante no relacionada expresada en sistema pRSET/ *BL21 pLys*; M: marcador de peso molecular (*Page Ruler Prestained Protein Ladder*). La flecha indica el producto esperado de aproximadamente 32,6 kDa.

Análisis de la solubilidad de la proteína Vtg-B recombinante

Una vez establecida la cinética de expresión de la proteína de interés en cultivos inducidos, es fundamental determinar la solubilidad de dicha proteína con el propósito de purificarla por columnas de afinidad NTA-Níquel.

Un cultivo de 3 ml de bacterias transformadas con pRSet-Vtg-B fue inducido con IPTG durante 90 minutos. Se obtuvo el *pellet* bacteriano por centrifugación y se lo resuspendió, en 180 μ l de *buffer* de lisis (Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 30 mM, Tween 20 0,25%, β -mercaptoetanol 10 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, pH 7), se agitó con vortex 2 veces y se congeló a -20°C por 2 h. Luego se realizó una extracción secuencial según el esquema detallado en la figura (Figura V A). Posteriormente el *pellet* bacteriano resuspendido, se sonicó con 2 pulsos a intensidad media y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C . El sobrenadante (S1) se almacenó y el *pellet* se resuspendió en 180 μ l de *buffer* de lisis, se centrifugó de manera similar, se almacenó el sobrenadante 2 (S2) y el *pellet* se resuspendió en urea 8M. Luego del centrifugado, se obtuvo el sobrenadante 3 (S3) y el *pellet* final (P) se resuspendió en urea 8 M. Las muestras S1, S2, S3 y P se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

Se determinó que la proteína Vtg-B recombinante se encontraba en la fracción insoluble y se logró solubilizar con el tratamiento con urea 8M. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por *Western blot* utilizando anticuerpos dirigidos contra el tracto de histidinas presentes en la proteína Vtg-B y se determinó que ésta se solubilizaba mayoritariamente en la fracción S3 (Figura V B).

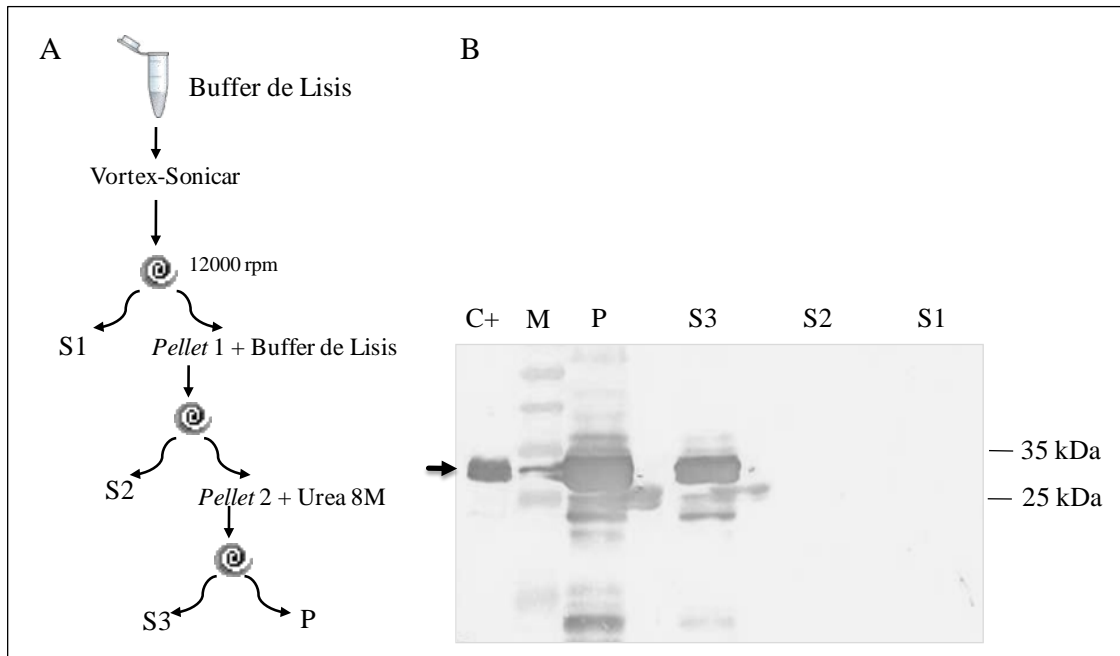


Figura V: Análisis de la solubilidad de la proteína Vtg-B recombinante. **A:** Esquema de la extracción secuencial. **B:** Análisis por *Western blot* de las fracciones de la extracción secuencial utilizando un anticuerpo específico contra el tracto de histidinas M: Marcador de peso molecular (*Page Ruler Prestained Protein Ladder*). La flecha indica el producto esperado.

Purificación de la proteína recombinante Vtg-B por columna de afinidad

La fracción S3 fue purificada por columna de Ni-NTA en condiciones desnaturizantes. Se utilizó la resina Ni-NTA agarosa (Qiagen), según las indicaciones del fabricante. Previo a su utilización, para equilibrar la resina se realizaron 3 lavados con un volumen de H₂O destilada y 2 lavados con un volumen de *buffer* A (6 M isotiocianato de guanidinio, NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8). Los lavados se realizaron por centrifugación a 1500 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Un cultivo de 100 ml de bacterias *E. coli* BL21 *plys*-pRset-Vtg-B se creció hasta $D.O_{600}=0,5$, se indujo con IPTG durante 90 min y se cosecharon las bacterias por centrifugación a baja velocidad. El *pellet* (0,67 g) de bacterias se resuspendió en 3,35 ml de *buffer* A y se sonicó 2 veces de 5 pulsos cada una, a intensidad media, en frío. Se incubó con agitación suave a temperatura ambiente hasta que estuviera traslúcido. Posteriormente, se centrifugó 10 min a 10000 g y el sobrenadante se mezcló con 1 ml de resina Ni-NTA agarosa equilibrada. Se incubó 1h con agitación a temperatura ambiente (unión de la proteína en *batch*) y se armó una columna para realizar los lavados y eluciones por disminución de pH. Primeramente se colectó el percolado y se hicieron 2 lavados con 2,5 ml de *buffer* A, 6 lavados con 2 ml de *buffer* C (8 M isotiocianato de guanidinio, 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris HC, pH 6,3) y 4 eluciones con 0,5 ml de *buffer* E (8 M isotiocianato de guanidinio, 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris HCl, pH 4,5). Finalmente, se realizó la elución final de las proteínas unidas con 0,5 ml de EDTA 0,5 M. Las muestras se almacenaron a $-70^{\circ}C$ hasta su análisis por *dot blot* y *Western blot* empleando anticuerpos anti-His.

Análisis de la expresión de proteínas por la técnica de dot-blot

Se utilizó sistema *Bio Rad Microfiltration Bio Dot System*. Brevemente, se humedecieron 2 papeles de filtro Whatmann 3MM y 1 una membrana de nitrocelulosa en PBS. Se armó el sistema según indicaciones del fabricante, se colocaron las muestras (15 -20 μ l) en diferentes pocillos, se aplicó vacío durante unos segundos y se desarmó el sistema. La detección inmunológica de proteínas se realizó sobre la membrana de nitrocelulosa de manera similar a la descrita para la técnica de *Western blot* (capítulo 3, sección 3.4.4).

En la Figura VI se observan los resultados de la purificación del fragmento Vtg-B. En las muestras colectadas de cada fracción se analizó la expresión de proteínas por las técnicas de *dotblot* y *Western blot*. Se analizaron el percolado (Per), las muestras de los lavados con *buffer* A (A1 a A3, pH 8) y *buffer* C (C1 al C6, pH 6,3), las eluciones con *buffer* E (E1 al E5) así como la fracción final y el *pellet* (P1). Se determinó que la proteína Vtg-B recombinante se eluye mayoritariamente con *buffer* de elución (*buffer* E; pH 4,5) en las fracciones E2 a E4 (Figura VI B).

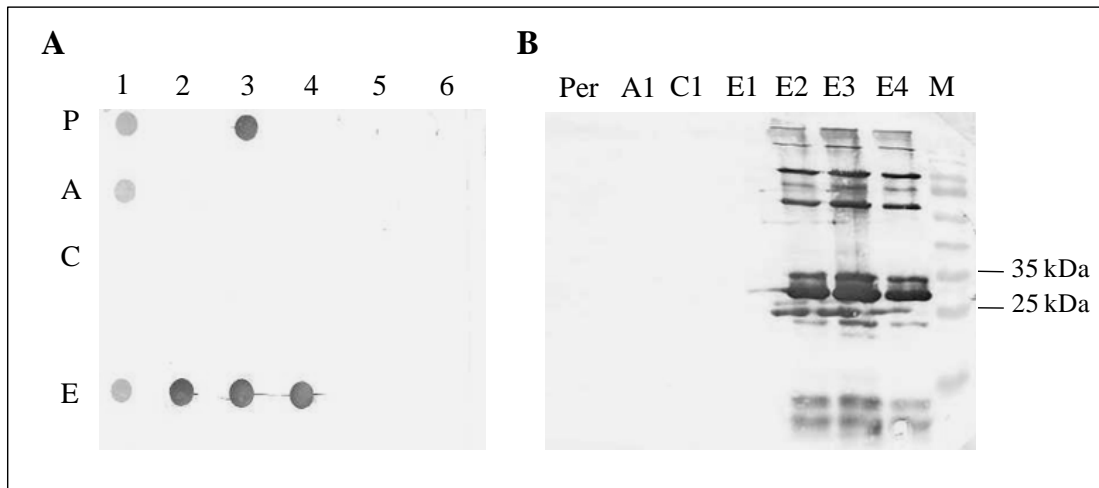


Figura VI: Purificación del fragmento Vtg-B por columna de Ni-NTA. **A:** *Dot-blot*, se muestran las fracciones obtenidas con *buffers* A, C, E, el percolado (P1) y la fracción final (P3). **B:** *Western blot*. Per: percolado; A1: lavado 1 de 2 (pH 8); C1: lavado 1 de 6 (pH 6,3); E1 a E4: eluciones (pH 4,5). M: Marcador de peso molecular (*Page Ruler Prestained Protein Ladder*). Se utilizó como anticuerpo primario anti-His y como anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina.

Electroelución de la proteína Vtg-B purificada

Luego de la purificación de la proteína Vtg-B a través de una columna de afinidad Ni-NTA, se procedió a realizar un paso adicional de purificación mediante PAGE-SDS/electroelución. Las muestras provenientes de la columna de afinidad que poseían una banda reactiva del tamaño esperado por la técnica de *Western blot* (fracciones E2 a E4) se sembraron en un gel 12% PAGE-SDS y se realizó la electroforesis de manera similar a la descrita anteriormente. Luego de la electroforesis, los geles se desmontaron y tiñeron con azul de Coomassie. La porción del gel fuertemente teñida con el colorante, del tamaño esperado, fue escindida con un bisturí y colocada dentro de una membrana de diálisis (Spectrapor, cut-off 12-14kDa) conteniendo 1 ml de *buffer* Tris-Gli-SDS. Se colocó en una cuba horizontal de electroforesis conteniendo el mismo *buffer* y se realizó la electroelución a 200V durante 2 h en frío. Posteriormente, se recuperó el *buffer* contenido dentro de la membrana de diálisis y se almacenó a -20°C hasta su utilización. Una muestra de la solución conteniendo la proteína de interés electroeluída fue analizada por *Western blot* y, además, se procedió a realizar una cuantificación por PAGE-SDS/tinción Coomassie respecto de una curva estándar de seroalbúmina bovina (BSA).

Inmunización de ratones con la proteína recombinante Vtg-B

Con el fin de obtener un suero policlonal específico contra la proteína Vtg-B se inmunizaron ratones con la proteína recombinante obtenida como se describe en el punto anterior.

Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c AnN de 8 a 10 semanas de edad certificados como libres de patógenos específicos (SPF). Los animales se adquirieron en el Bioterio de la Fundación Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

El inmunógeno se formuló con 5 – 7 µg de la proteína recombinante electroeluída (en un volumen de 300µl), se agregó Tween 40 en una cantidad correspondiente al 0,01 % del volumen final, se mezcló con vortex y se agregaron 300µl de adyuvante incompleto de Freund (Sigma). El día uno se inmunizaron cuatro ratones con una dosis inicial de antígeno aplicada por vía intraperitoneal (ip). Se obtuvo suero pre-inmune el día anterior a la primera vacunación como control. Se realizaron vacunaciones de refuerzo a los 21 y 56 días y sangrías exploratorias a los 19, 42 y 76 D.P.I. Los ratones se sangraron a blanco con heparina a los 81 D.P.I., obteniéndose 1 ml de plasma por ratón (Figura VII).

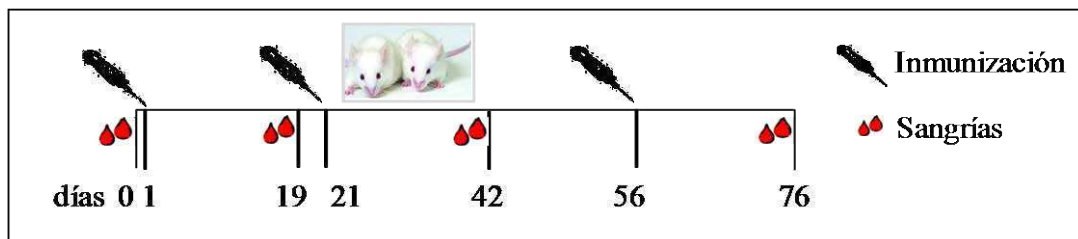


Figura VII: Esquema de inmunización de ratones.

La presencia de anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína Vtg-B en el suero de los ratones inmunizados fue analizada por *Western blot* contra el fragmento Vtg-B purificado. Como se muestra en la Figura VIII, el suero de los animales sin inmunizar no posee anticuerpos específicos contra Vtg-B (tiempo 0) y se logró inducir una respuesta humoral específica contra Vtg-B en los 4 animales inoculados con la proteína recombinante.

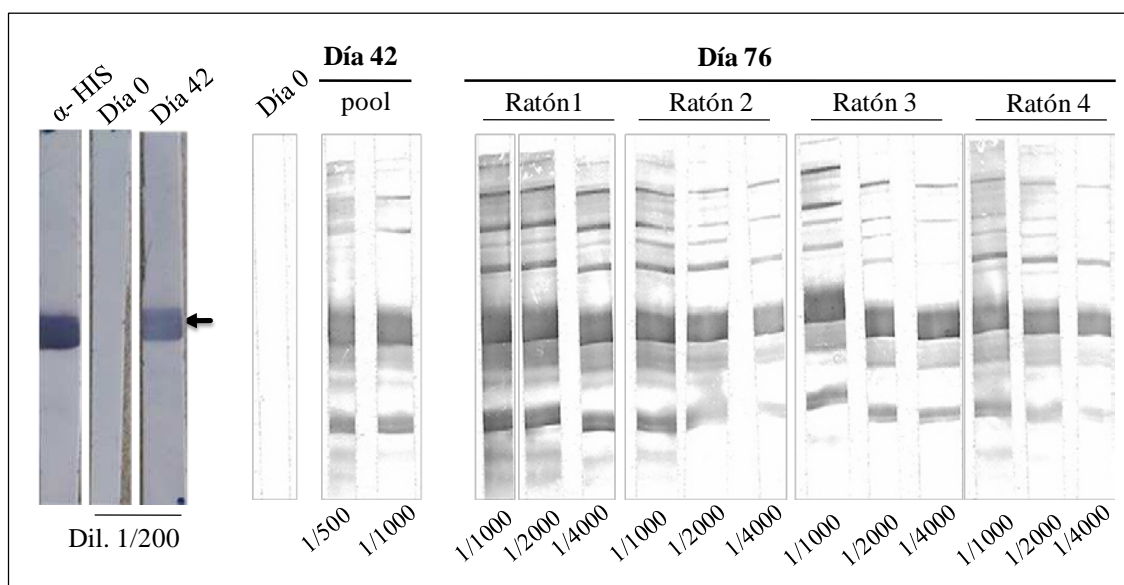


Figura VIII: Análisis por *Western blot* de los sueros anti Vtg-B de los ratones inmunizados con la proteína recombinante del fragmento Vtg-B purificado. La flecha indica el producto esperado de aproximadamente 32,6 kDa.

Finalmente, para determinar la especificidad del suero anti-Vtg-B obtenido, se realizó un ensayo de *Western blot* contra muestras de plasma de juveniles de *C. carpio* inyectados con 10 mgE2/Kg de peso corporal como control positivo (C+) o con la misma proporción de aceite de maíz como control negativo (C-).

La Figura IX indica la presencia de una banda reactiva de alto peso molecular, compatible con el peso molecular aparente esperado para la proteína Vtg en los ejemplares inyectados con E2 como control positivo (C+). Es importante destacar que la intensidad de las bandas se corresponde con la concentración de proteínas sembradas en cada caso. Por último, en las muestras de plasma de las carpas inyectadas con aceite de maíz como control negativo, no se observaron bandas reactivas. Por su parte, al evaluar expresión de la proteína Vtg en condiciones de campo (Figura X), se detectó la presencia de una banda reactiva correspondiente a la proteína Vtg sólo en los ejemplares de *C. carpio* expuestos en jaulas en el río Luján (S1) y en el control positivo inyectado con E2 (C+). No se detectó la presencia de Vtg en ejemplares expuestos en un sitio de referencia (SR II) ni en los que permanecieron en jaulas sumergidas en el Río de la Plata (PL1) (ver capítulo 7). En conjunto, los resultados

obtenidos indican que se obtuvo un suero específico dirigido contra la proteína Vtg de *C. carpio* útil como herramienta para la detección de los efectos de compuestos desorganizadores endócrinos para esta especie estandarizada.

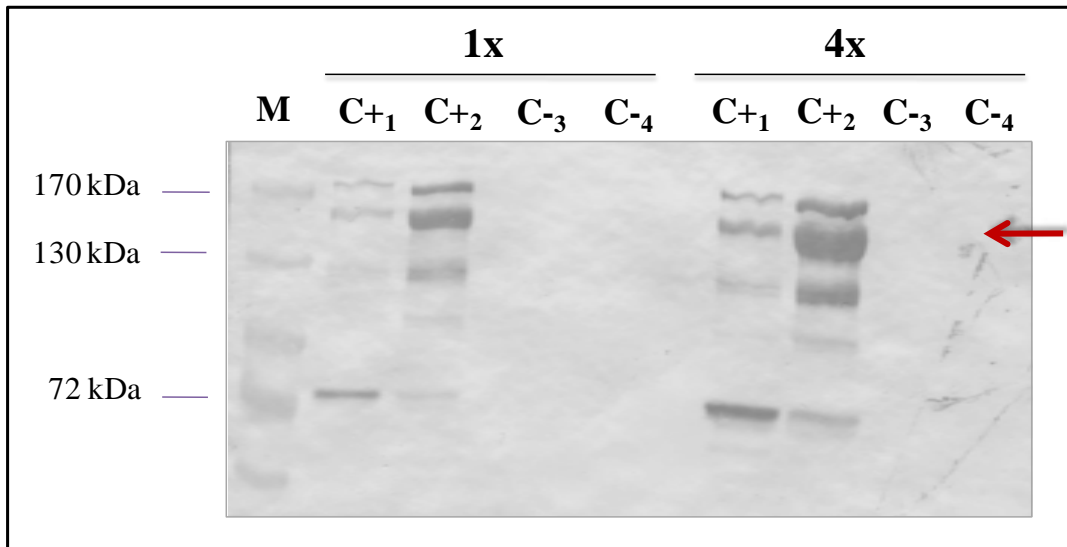


Figura IX. Análisis por *Western blot* de Vtg en plasma de juveniles de *C. carpio*. C+ y C-, muestras de plasma colectadas 72 h después de la administración de una inyección intraperitoneal con 17 β -estradiol (E2) o con aceite de maíz, respectivamente; C₁, C₂, C₃, C₄, muestras de plasma con 25, 50, 23 y 32 μ g de proteínas totales por μ l sembrado (**1x**); (**4x**), las mismas muestras de plasma con una concentración de proteínas totales 4 veces mayor; M, marcador de peso molecular (*Page Ruler*TM. *Prestained Protein Ladder*). Se utilizó el antisuero anti Vtg-B de *C. carpio* (1:4000) como anticuerpo primario y anti ratón conjugado a la enzima fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo.

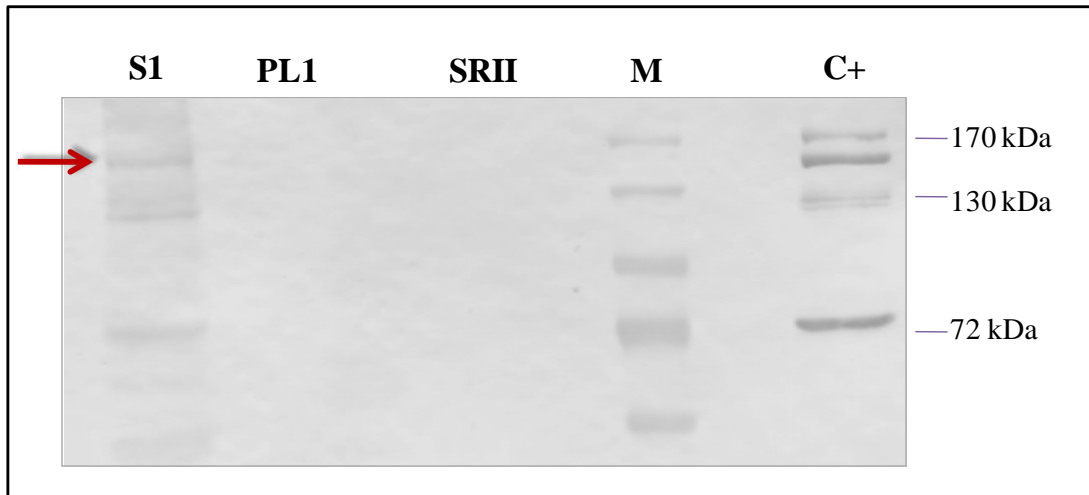


Figura X. Análisis por *Western blot* de Vtg en plasma de juveniles de *C. carpio* en condiciones de campo. C+, muestra de plasma colectada 72 h después de la administración de una inyección intraperitoneal con 17 β -estradiol (E2); S1, PL1 y SR11, muestras de plasma de peces expuestos *in situ* en el río Luján, Río de la Plata y sitio de referencia; M, marcador de peso molecular (*Page Ruler*TM. *Prestained Protein Ladder*). Se utilizó el antisuero anti Vtg-B de *C. carpio* (1:4000) como anticuerpo primario y anti ratón conjugado a la enzima fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo.

Bibliografia citada

- AABA. (2010). Atlas Ambiental de Buenos Aires. <http://www.atlasdebuenosaires.gov.ar>.
- Abel PD. (1989). The toxicity of pollutants to aquatic organisms. En: Water pollution biology, Eds. Ellis Horwood. 231 pp.
- ACUMAR (2012). Autoridad de Cuenca Matanza-Riachuelo. Sistema de indicadores. Calidad de aguas superficiales de la Cuenca Matanza Riachuelo, parámetros físico-químicos y bacteriológicos. Campañas Mayo y Agosto 2012. <http://www.ambiente.gov.ar>
- Ahmad I, Pacheco M, Santos MA. (2004). Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* 57: 290–302.
- Aizpún JE, Moreno VJ, Gerpe MS, Miglioranza KSB, Gonzalez M, y Ondarza PM. (2004). Informe final: proyecto PNUD/GEF/RLA/99/G31 Acuerdo 082, Protección ambiental del Río de la Plata y su frente marítimo: prevención y control de la contaminación y preservación de hábitats. 130pp.
- Ale A, Cazenave J, Bacchetta C. (2012). Respuestas de marcadores hematológicos y enzimáticos en *Hoplosternum littorale* expuestos a metales individuales y en mezcla. 5° Congreso Argentino de Limnología, Santa Fe.
- Almeida JS, Meletti PC, Martinez CBR. (2005). Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp Biochem Physiol* 140 C: 356-363.
- Almroth BC, Sturve J, Berglund A, Förlin L. (2005). Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquat Toxicol* 73:171-180.
- Almroth BC, Albertsson E, Sturve J, Förlin L. (2008 a). Oxidative stress, evident in antioxidant defences and damage products, in rainbow trout caged outside a sewage treatment plant. *Ecotoxicol Environ Saf* 70:370–378
- Almroth BC, Sturve J, Stephensen E, Holth TF, Förlin L. (2008 b). Protein carbonyls and antioxidant defenses in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. *Mar Environ Res* 66: 271–277.
- Aluru N y Vijayan MM. (2004). β -Naphthoflavone disrupts cortisol production and liver glucocorticoid responsiveness in rainbow trout. *Aquat Toxicol* 67: 273–285.
- Amado L, Robaldo R, Geracitano L, Monserrat J, Bianchini A. (2006). Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). *Mar Pollut Bull* 52: 207-213.
- APHA (American Public Health Association). (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA, Washington DC.
- Ariese F, Kok SJ, Verkaik M, Gooijer C, Velthorst NH, Hofstraat JW. (1993). Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: A rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. *Aquat Toxicol* 26: 273-286.
- Arreghini S, de Cabo L, Seoane R, Tomazin N, Serafini R, Fabrizio de Iorio, A. (2007). A methodological approach to water quality assessment in an ungauged basin, Buenos Aires, Argentina. *Geo Journal* 70: 281–288.

- Arukwe A, Yadetie F, Male R, Goksøyr A. (2001). In vivo modulation of nonylphenol-induced zonation and vitellogenesis by the antiestrogen, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB-77) in juvenile fish. *Environ Toxicol Pharmacol* 10: 5-15.
- Ascar MI y de la Torre FR. (2005). Biomarcadores hepáticos de la carpa (*Cyprinus carpio* L.): respuestas antioxidantes inducidas por la β -naftoflavona, un hidrocarburo aromático policíclico. *Biología Acuática* 22: 19-28.
- Ascar, MI. (2006). Biomarcadores hepáticos de *Cyprinus carpio*: un estudio de línea de base. Tesis para optar al título de Licenciado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 83 pp.
- Asensio V, Rodríguez-Ruiz A, Garmendia L, Andre J, Kille P, Morgan AJ, Soto M, Marigómez I. (2013). Towards an integrative soil health assessment strategy: A three tier (integrative biomarker response) approach with *Eisenia fetida* applied to soils subjected to chronic metal pollution. *Sci Total Environ* 442: 344-365.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. (2005). Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., United States of America.
- Avci A, Kaçmaz M, Duraka I. (2005). Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. *Ecotoxicol Environ Saf* 60: 101–105.
- Bagenal TB y Tesch FW. (1978). Methods for assessment of fish production in fresh waters. En: Bagenal, T.B. (Ed), Age and growth, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 101-136.
- Bainy A, Saito E, Carvalho P, Junqueira V. (1996). Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquat Toxicol* 34: 151-162.
- Balk L, Larsson Å, Förlin L. (1996). Baseline studies of biomarkers in the feral female perch (*Perca fluviatilis*) as tools in biological monitoring of anthropogenic substances. *Mar Environ Res* 42: 203-208.
- Barra R, Colombo JC, Gamboa N, Eguren G, Jardim W. (2002). Regionally based assessment of persistent toxic substances: eastern and western South America regional report, Argentina, Bolivia, Brazil, Chile, Ecuador, Paraguay, Peru, Uruguay. United Nation Environment Program, Chemicals, UNEP-GEF, 101p.
- Barra R, Castillo C, Machado Torres JP. (2007). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the South American Environment. *Rev Environ Contam Toxicol* 191: 1-22.
- Beers RF y Sizer IW. (1952). A Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195: 133-140.
- Beliaefe B y Burgeot T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 21: 1316–1322.
- Berón L. (1984). Evaluación de la Calidad de las Aguas. Secretaría de Vivienda y Ordenamiento Ambiental. Buenos Aires: Ministerio de Salud y Acción Social. pp 1–51.
- Bervoets L, Van Campenhout K, Reynders H, Knapen D, Covaci A, Blust R. (2009). Bioaccumulation of micropollutants and biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 720–728.
- Bettinetti R, Cuccato D, Galassi S, Provini A. (2002). Toxicity of 4-nonylphenol in spiked sediment to three populations of *Chironomus riparius*. *Chemosphere* 46: 201-207.

- Beyer J, Sandvik M, Hylland K, Fjeld E, Egaas E, Aas E, Skåre JU, Goksøyr A. (1996). Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sarrfjorden, Norway. *Aquat Toxicol* 36: 75-98.
- Bilos C, Colombo JC, Rodriguez Presa MJ. (1998). Trace metals in suspended particles, sediments and asiatic clams (*Corbicula fluminea*) of the Río de la Plata estuary, Argentina. *Environ Pollut* 99: 1-11.
- Bonacci S, Corsi I, Chiea R, Regoli F, Focardi S. (2003). Induction of EROD activity in European eel (*Anguilla anguilla*) experimentally exposed to benzo[a]pyrene and β -naphthoflavone. *Environ Int* 29: 467-473.
- Bonefeld-Jørgensen EC, Andersen HR, Rasmussen TH, Vinggaard AM. (2001). Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology* 158: 141-153.
- Bowen S H. (1983). Detritivory in neotropical fish communities. *Environ Biol Fish* 9: 137-144.
- Bozcaarmutlu A, Sapmaz C, Aygun Z, Arinç E. (2009). Assessment of pollution in the West Black Sea Coast of Turkey using biomarker responses in fish. *Mar Environ Res* 67: 167-176.
- Braga da Fonseca M, Gluszcak L, Silveira Moraes B, Cavalheiro de Menezes C, Pretto A, Tierno MA, Zanella R, Ferreira Gonçalves F, Loro VL. (2008). The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol Environ Safe* 69: 416-420.
- Brian JV, Harris CA, Scholze M, Backhaus T, Booy P, Lamoree M, Pojana G, Jonkers N, Runnalls T, Bonfà A, Marcomini A, Sumpter JP. (2005). Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environ Health Perspect* 113: 721-728.
- Burgess RM, Terletskaia AV, Milyukin MV, Povolotskii M, Demchenko VY, Bogoslavskaya TA, Topkin YV, Vorobyova TV, Petrov AN, Lyashenko A, Ho KT. (2009). Concentration and distribution of hydrophobic organic contaminants and metals in the estuaries of Ukraine. *Mar Pollut Bull* 58: 1103-1115.
- Busso AS. (2010). Geología, Hidrología, Hidrogeología en la Cuenca del Río Luján. En: CT. Carballo (Ed.). Información ambiental de la cuenca del río Luján. Prometeo, Buenos Aires, pp. 97-122.
- Cachot J, Geffard O, Augagneur S, Lacroix S, Le Menach K, Peluhet L, Couteau J, Denier X, Devier MH, Pottier D, Budzinski H. (2006). Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquat Toxicol* 79: 257-267.
- Cachot J, Law M, Pottier D, Peluhet L, Norris M, Budzinski H, Winn R. (2007). Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using λ transgenic medaka. *Environ Sci Technol* 41: 7830-7836.
- Camargo MMP y Martínez CBR. (2006). Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environ Toxicol Pharmacol* 21: 61-69.
- Cappato J y Yanosky A. (2009). Uso sostenible de peces en la Cuenca del Plata. Evaluación subregional del estado de amenaza, Argentina y Paraguay. Ed. UICN, Gland, Suiza. 76 p.

- Carballo M, Aguayo S, de la Torre A, Muñoz MJ. (2005). Plasma vitellogenin levels and gonadal morphology of wild carp (*Cyprinus carpio* L.) in a receiving rivers downstream of Sewage Treatment Plants. *Sci Total Environ* 341: 71-79.
- Carballo CT. (2010). Información ambiental de la Cuenca del río Luján. Ed. Prometeo, Bs As, Argentina.
- Carrquiriborde P, Díaz J, Mugni H, Bonetto C, Ronco AE. (2007). Impact of cypermethrin on stream fish populations under field-use in biotech-soybean production. *Chemosphere* 68: 613-621.
- Casini S, Fossi MC, Mori G, Bjornstad A. (2002). Vitellogenin induction in *Cyprinus carpio* treated with 17 β -estradiol and 4-nonylphenol. *Environ Monit Assess* 75: 235-239.
- Cataldo D, Colombo JC, Boltovskoy D, Bilos C, Landoni P. (2001). Environmental toxicity assessment in the Paraná river delta (Argentina): simultaneous evaluation of selected pollutants and mortality rates of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) early juveniles. *Environ Pollut* 112: 379-389.
- Cazenave J, Wunderlin DA, Hued AC, Bistoni MA. (2005). Haematological parameters in a neotropical fish, *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Callichthyidae), captured from pristine and polluted water. *Hydrobiologia* 537: 25-33.
- Cazenave J, Bistoni MA, Pesce SF, Wunderlin DA. (2006). Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquat Toxicol* 76: 1-12.
- Cazenave J, Bacchetta C, Parma MJ, Scarabotti PA, Wunderlin DA. (2009). Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environ Pollut* 157: 3025-3033.
- Cazenave J, Bacchetta C, Ale A, Campana M, Parma MJ. (2012). Respuestas de biomarcadores en *Prochilodus lineatus* expuestos *in situ* a un efluente cloacal. Resumen en XI Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral. III Reunión Argentina de Ciencias Naturales. Córdoba.
- CCME, Canadian Council of Ministers of the Environment. 1999. Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Winnipeg, Canada. Updated 2002.
- Christensen LJ, Korsgaard B, Bjerregaard P. (1999). The effect of 4-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder *Platichthys flesus*. *Aquat Toxicol* 46: 211-219.
- CIC. (2013). Comité Intergubernamental de Coordinador de los Países de la Cuenca del Plata. <http://www.cicplata.org>
- Colombo JC, Pelletier E, Brochu C, Khalil M. (1989). Determination of hidrocarbon sources using n-alkane and polyaromatic hidrocarbon distribution indexes. case study: Río de la Plata estuary, Argentina. *Environ Sci Technol*. 23, 888-894.
- Colombo JC, Khalil MF, Arnac M, Horth AC. (1990). Distribution of chlorinated pesticides and individual polychlorinated biphenyls in biotic and abiotic compartments of the Rio de La Plata, Argentina. *Environ Sci Technol* 24, 498-505.
- Colombo JC, Bilos C, Campanaro M, Rodriguez Presa MJ, Catoggio JA. (1995). Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides by the asiatic clam *Corbicula fluminea*: its use as sentinel organism in the Río de la Plata estuary, Argentina. *Environ Sci Technol* 29: 914-927.

- Colombo JC, Brochu C, Bilos C, Landoni P, Moore S. (1997). Long-term accumulation of individual PCBs, dioxins, furans, and trace metals in asiatic clams from the Río de la Plata estuary, Argentina. *Environ Sci Technol* 31: 3551-3557.
- Colombo JC, Bilos C, Remes Lenicov M, Colautti D, Landoni P, Brochu C. (2000). Detritivorous fish contamination in the Río de la Plata estuary: a critical accumulation pathway in the cycle of anthropogenic compounds. *Can J Fish Aquat Sci* 57, 1139-1150.
- Colombo JC, Cappelletti N, Barreda A, Migoya MC, Skorupka CN. (2005a). Vertical fluxes and accumulation of PCBs in coastal sediments of the Río de la Plata estuary, Argentina. *Chemosphere* 61, 1345–1357.
- Colombo JC, Barreda A, Bilos C, Cappelletti N, Demichelis S, Lombardi P, Migoya MC, Skorupka C, Suárez G. (2005b). Oil spill in the Río de la Plata estuary, Argentina: 1. Biogeochemical assessment of waters, sediments, soils and biota. *Environ Pollut* 134: 277–289.
- Colombo JC, Cappelletti N, Lasci J, Migoya MC, Speranza E, Skorupka CN. (2006). Sources, Vertical Fluxes, and Equivalent Toxicity of Aromatic Hydrocarbons in Coastal Sediments of the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environ Sci Technol* 40: 734-740.
- Colombo JC, Cappelletti N, Migoya M, Speranza E. (2007). Bioaccumulation of anthropogenic contaminants by detritivorous fish in the Río de la Plata estuary: 2-Polychlorinatedbiphenyls. *Chemosphere* 69, 1253–1260.
- Colombo JC, Cappelletti N, Williamson M, Migoya MC, Speranza E, Sericano J, Muir DCG. (2011). Risk ranking of multiple-POPs in detritivorous fish from the Río de la Plata. *Chemosphere* 83: 882-889.
- Corsi I, Mariottini M, Sensini C, Lancini L, Focardi S. (2003). Fish as bioindicators of brackish ecosystem health: integrating biomarker responses and target pollutant concentrations. *Oceanol Acta*. 26, 129–138.
- Costa PM, Caeiro S, Lobo J, Martins M, Ferreira AM, Caetano M, Vale C, DelValls TA, Costa MH. (2011). Estuarine ecological risk based on hepatic histopathological indices from laboratory and in situ tested fish. *Mar Pollut Bull* 62: 55-65.
- Costa PM, Caeiro S, Vale C, DelValls TA, Costa MH. (2012). Can the integration of multiple biomarkers and sediment geochemistry aid solving the complexity of sediment risk assessment? A case study with a benthic fish. *Environ Pollut* 161: 107-120.
- Crane M, Burton GA, Culp JM, Greenberg MS, Munkittrick KR, Ribeiro R, Salazar MH, St-Jean SD. (2007). Review of aquatic in situ approaches for stressor and effect diagnosis. *Integrated Environmental Assessment and Management* 3 (2): 234-245.
- da Silva TF, de Almeida Azevedo D, de Aquino Neto FR. (2007). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments and waters from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *J Braz Chem Soc* 18: 628-637.
- de la Torre FR, Ferrari L, Salibián A. (2000). Long-term in situ water toxicity bioassays in the Reconquista river (Argentina) with *Cyprinus carpio* as sentinel organism. *Water Air Soil Poll* 121: 205-215.
- de la Torre FR, Ferrari L, Salibian A. (2002). Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comp Biochem Physiol* 131 C: 271-280.

- de la Torre FR, Salibián A, Calamante G. (2003). Obtención de anticuerpos policlonales específicos dirigidos contra la proteína CYP1A de *Cyprinus carpio*. *Acta Toxicológica Argentina* 11 (2): 78.
- de la Torre FR, Ferrari L, Salibián A. (2005) Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) applied to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere* 59: 577-583.
- de la Torre FR, Salibián A, Calamante G. (2006). Evaluación de la expresión de CYP1A de *Cyprinus carpio* mediante técnicas moleculares. In: Herkovits J, (Ed). *Salud Ambiental y humana: una visión holística*. Argentina: Publicación SETAC. pp 122–124.
- Depetris PJ. (1995). Los sedimentos fluviales y lacustres: Granulometría y contenido de materia orgánica. En: Lopretto EC y Tell G, (Eds). *Ecosistemas de aguas continentales: metodologías para su estudio*. La Plata: Ediciones Sur. pp 67–84.
- Di Giulio RT y Meyer JN. (2008). Reactive oxygen species and oxidative stress. En: Di Giulio RT, Hinton, D. (Eds.). *The toxicology of fishes*. Taylor & Francis Group, NY, Boca Raton, FL, pp. 273-324.
- Di Marzio WD, Tortorelli MC, Freyre LR. (2003). Diversidad de peces en un arroyo de llanura. *Limnetica* 22 (3-4): 71-76.
- Di Marzio WD, Sáenz M, Alberdi J, Tortorelli, MC, Galassi S. (2005). Risk assessment of domestic and industrial effluents unloaded into a freshwater environment. *Ecotoxicol Environ Saf* 61: 380-391.
- Eissa BL. (2009). Biomarcadores comportamentales, fisiológicos y morfológicos de exposición al cadmio en peces pampeanos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 209 pp.
- Erickson RJ, Nichols JW, Cook PM, Ankley GT. (2008). Bioavailability of Chemical Contaminants in Aquatic Systems. En: Di Giulio RT y Hinton DE (Eds). *The Toxicology of Fishes*. Taylor & Francis Group, NY, Boca Raton, FL, pp. 9-54.
- Evers C, Lopez J, Gómez N, Rodrigues Capítulo A, Janiot LJ. (1997). Calidad de las aguas de la franja costera sur del Río de la Plata (San Fernando-Magdalena). Consejo Permanente para el monitoreo de la calidad de las aguas de la franja costera sur del Río de la Plata.
- Falfushynska HI y Stolyar OB. (2009). Responses of biochemical markers in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 729-736.
- Feijoó CS, Giorgi A, García ME, Momo F. 1999. Temporal and spatial variability in streams of a pampean basin. *Hydrobiologia* 394: 41–52.
- Fent K. (2004). Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*. 205: 223-240.
- Fernandez-Jover D, Lopez Jimenez JA, Sanchez-Jerez P, Bayle-Sempere J, Gimenez Casalduero F, Martinez Lopez FJ, Dempster T. (2007). Changes in body condition and fatty acid composition of wild Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*, Steindachner, 1868) associated to sea cage fish farms. *Mar Environ Res* 63: 1-18.
- Ferreira M, Moradas-Ferreira P, Reis-Henriques MA. (2005). Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquat Toxicol* 71: 39-48.

- FREPLATA (2003). Aportes de contaminantes y sedimentos al Río de la Plata interior franja costera: calidad de agua, sedimentos y presencia de contaminantes en biota. Proyecto PNUD/GEF/RLA/99/G31, Protección ambiental del Río de la Plata y su frente marítimo: prevención y control de la contaminación y preservación de hábitats. 32pp.
- Genovese G, Da Cuña R, Towlec DW, Maggese MC, Lo Nostro F. (2011). Early expression of zona pellucida proteins under octylphenol exposure in *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae). *Aquat Toxicol* 101: 175–185.
- Genovese G, Regueira M, Piazza Y, Towle DW, Maggese MC, Lo Nostro F. (2012). Time-course recovery of estrogen-responsive genes of a cichlid fish exposed to waterborne octylphenol. *Aquat Toxicol* 114–115: 1– 13.
- Giorgi A, Banchemo M, Rivelli S, Clarenzio O, Cuevas W. (1999). Algunas variables indicativas de la calidad del agua del tramo medio del río Luján. *Actas VII Jornadas pampeanas de Ciencias Naturales, COPROCNA*. Santa Rosa, La Pampa, Argentina. (1999), pp 155-161.
- Giorgi A, Malacalza L. (2002). Effect of and industrial discharge on water quality and periphyton structure in a pampean stream. *Environ Monit Assess* 75: 107-119.
- Gluszcak L, dos Santos Miron D, Crestani M, Braga da Fonseca, M, de Araujo Pedron F, Frescura Duarte M, Pimentel Vieira VL. (2006). Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol Environ Safe* 65: 237-241.
- Goksøyr A y Husøy AM. (1998). Immunochemical approaches to studies of CYP1A localization and induction by xenobiotic in fish. En: Braunbeck T, Hinton DE, Streil B (Eds). *Fish Ecotoxicology*. Basel, Switzerland, pp. 165-202.
- Gómez SE. (1993). Concentración letal de oxígeno disuelto para *Corydoras paleatus* y *Pimelodella laticeps* (Pisces, Siluriformes). *Rev Mus Arg Cs Nat B*. Rivadavia, Hidrobiología 7: 31-45.
- Gunawickrama SHNP, Aarsæther N, Orbea A, Cajaraville MP, Goksøyr A. (2008). PCB77 (3,3,4,4-tetrachlorobiphenyl) co-exposure prolongs CYP1A induction, and sustains oxidative stress in B(a)P-exposed turbot, *Scophthalmus maximus* in a long-term study. *Aquat Toxicol* 89: 65-74.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. (1974). Glutathione-S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.
- Hale RC, Smith CL, de Fur PO, Harvey E, Bush, EO, La Guardia MJ, Vadas GG. (2000). Nonylphenols in sediments and effluents associated with diverse wastewater outfalls. *Environ Toxicol Chem*. 19 (4): 946-952.
- Halliwell B y Gutteridge JMC. (1999). *Free radicals in biology and medicine*, 3ra ed. Oxford University Press, Oxford.
- Haritash AK y Kaushik CP. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J Hazard Mater*. 169: 1-15.
- Hartl MGJ. (2002). Benthic fish as sentinel organisms of estuarine sediment toxicity. Bright, M., P.C. Dworschak & M. Stachowitsch (Eds.) *The Vienna School of Marine Biology: A Tribute to Jörg Ott*. Facultas Universitätsverlag, Wien: 89-100

- Hartl MGJ, Kilemade M, Sheehan D, Mothersill C, O'Halloran J, O'Brien NM, van Pelt FN. (2007). Hepatic biomarkers of sediment-associated pollution in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Mar Environ Res* 64: 191–208.
- Heinis LJ, Knuth ML, Liber K, Sheedy BR, Tunell RL, Ankley GT. (1999). Persistence and distribution of 4-nonylphenol following repeated application to littoral enclosures. *Environ Toxicol Chem* 18: 363-375.
- Hennies M, Wiesmann M, Allner B, Sauerwein H. (2003). Vitellogenin in carp (*Cyprinus carpio*) and perch (*Perca fluviatilis*): purification, characterization and development of an ELISA for the detection of estrogenic effects. *Sci Total Environ* 309: 93–103.
- Hermes-Lima M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. En Storey KB (Ed), *Functional metabolism: regulation and adaptation*. John Wiley & Sons, Inc., pp 319-368.
- Huang DJ, Zhang YM, Song G, Long J, Liu JH, Ji WH. (2007). Contaminants-induced oxidative damage on the carp *Cyprinus carpio* collected from the upper Yellow River, China. *Environ Monit Assess* 128: 483-488.
- Husøy AM, Myers MS, Goksøy A. (1996). Cellular localization of cytochrome P450 (CYP1A) induction and histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and European flounder (*Platichthys flesus*) after environmental exposure to contaminants by caging in Sjørfjorden, Norway. *Aquat Toxicol* 36, 53-74.
- Hutchinson TH, Field MDR, Manning MJ. (2003). Evaluation of non-specific immune functions in dab, *Limanda limanda* L., following short-term exposure to sediments contaminated with polyaromatic hydrocarbons and/or polychlorinated biphenyls. *Mar Environ Res* 55: 193-202.
- Huuskonen S, Lindström-Seppä P, Koponen K, Roy S. (1996). Effects of Non-ortho-substituted polychlorinated biphenyls (Congeners 77 and 126) on cytochrome P4501A and conjugation activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol* 113C (2): 205-213.
- Hyötyläinen T y Oikari A. (2004). Bioaccumulation of PAHs from creosote-contaminated sediment in a laboratory-exposed freshwater oligochaete, *Lumbriculus variegates*. *Chemosphere* 57:159-164.
- INDEC, Instituto Nacional de Estadísticas y Censos: www.censo2010.indec.gov.ar (página visitada, http://www.censo2010.indec.gov.ar/index_cuadros.asp)
- Jifa W, Zhiminga Y, Song X, Wang Y. (2006). Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabrax japonicus*) exposed to benzo[a]pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. *Ecotoxicol Environ Saf* 65: 230-236.
- Kavanagh RJ, Balch GC, Kiparissis Y, Niimi AJ, Sherry J, Tinson C, Metcalfe CD. (2004). Endocrine disruption and altered gonadal development in white perch (*Morone americana*) from the Lower Great Lakes Region. *Environ Health Perspect* 112: 898–902.
- Kirby MF, Smith AJ, Rooke J, Neall P, Scott AP, Katsiadaki I. (2007). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): System interaction, crosstalk and implications for monitoring. *Aquat Toxicol* 81: 233-244.
- Kilemade M, Hartl MGJ, O'Halloran J, O'Brien NM, Sheehan D, Mothersill C, van Pelt FNAM. (2009). Effects of contaminated sediment from Cork Harbour, Ireland on the cytochrome P450 system of turbot. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 747-755.

- Koenig S y Solé M. (2012). Natural variability of hepatic biomarkers in Mediterranean deep-sea organisms. *Mar Environ Res* 79: 122-131.
- Koponen K, Lindström-Seppä P, Kukkonen JVK. (2000). Accumulation pattern and biotransformation enzyme induction in rainbow trout embryos exposed to sublethal aqueous concentrations of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. *Chemosphere* 40: 245-253.
- Lalah JO, Schramm KW, Henkelmann B, Lenoir D, Behechti A, Günther K, Kettrup A. (2003). The dissipation, distribution and fate of a branched 14C-nonylphenol isomer in lake water/sediment systems. *Environ Pollut* 122: 195-203.
- Lavarias SML, Pasquevich Y, Arnal N, Demetrio P, Heras H. (2005). Niveles y probable origen de los hidrocarburos del arroyo pampeano El Pescado (Pcia. de Buenos Aires). *Acta Toxicol Argentina* 13:2-6.
- Li D, Kim M, Shim WJ, Yim UH, Oh JR, Kwon YJ. (2004). Seasonal flux of nonylphenol in Han River, Korea. *Chemosphere* 56: 1-6.
- Lima D, Santos MM, Ferreira AM, Micaelo C, Reis-Henriques MA. (2008). The use of the shanny *Lipophrys pholis* for pollution monitoring: A new sentinel species for the northwestern European marine ecosystems. *Environ Int* 34: 94-101.
- Lin ELC, Cormier SM, Torsella JA. (1996). Fish Biliary Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites Estimated by Fixed-Wavelength Fluorescence: Comparison with HPLC-Fluorescent Detection. *Ecotoxicol Environ Saf* 35: 16-23.
- Linde-Arias AR, Inácio AF, Novo LA, de Albuquerque C, Moreira JC. (2008). Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. *Environ Pollut* 156: 974-979.
- Liotta J. (2005). Distribución geográfica de los peces de aguas continentales de la República Argentina. Ed. ProBiota FCNyM, UNLP. pp.653.
- Livingstone D. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull* 42: 656-666.
- Lombardi PE, Peri SI, Verrengia Guerrero NR. (2010). ALA-D and ALA-D reactivated as biomarkers of lead contamination in the fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicol Environ Safe* 73: 1704-1711.
- López LC, Magdaleno A, de Cabo L, Nogueira MF, Bassi M, Arreghini S, Bassols G, Wagner M, Moretton J. (1998). Estudios de mutagenicidad, inhibición del crecimiento algal y contaminación química en aguas superficiales de un río urbano de Buenos Aires, Argentina. *Rev Int Contam Ambient* 14: 27-37.
- López HL, Menni RC, Miquelarena AM. (2003). Lista comentada de los peces del Río de la Plata. En: Resúmenes V Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar, Comunicaciones CARP-Cofremar, Item 24, UNMdP-IAPS-INIDEP, diciembre.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurements with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Lubet R, Mayer R, Cameron J, Schechtman L. (1985). Measurement of cytochrome P450 dependent dealkylation of alkoxyphenoxazones in hepatic S9s and hepatocyte homogenates: effect of dicumarol. *Mutat Res* 142: 127-131.

- Machado W, Silva-Filho EV, Oliveira RR, Lacerda LD. (2002). Trace metal retention in mangrove ecosystems in Guanabara Bay, SE Brazil. *Mar Pollut Bull* 44: 1277-1280.
- Malmström CM, Koponen K, Lindström-Seppä P, Bylund G. (2004). Induction and localization of hepatic CYP4501A in flounder and rainbow trout exposed to benzo[a]pyrene. *Ecotoxicol Environ Saf* 58: 365-372.
- Martins LKP, Nascimento IA, Fillmann G, King R, Evangelista AJA, Readman JW, Depledge MH. (2005). Lysosomal responses as a diagnostic tool for the detection of chronic petroleum pollution at Todos os Santos Bay, Brazil. *Environ Res* 99: 387-396.
- Mayer FL, Versteeg DJ, McKee MJ, Folmar LC, Graney RL, McCume DC, Rattner BA. (1992). En: *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle PM, Bergman HL. (Eds); Lewis Publishers, 5-85.
- McCord JM, Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055.
- Mdegela RH, Braathen M, Mosha RD, Skaare JU, Sandvik M. (2010). Assessment of pollution in sewage ponds using biomarker responses in wild African sharp-toothed catfish (*Clarias gariepinus*) in Tanzania. *Ecotoxicology* 19: 722-734.
- Meijide FJ. (2007). Desarrollo gonadal y diferenciación sexual en *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Efectos de la exposición a 4-tert-octilfenol y 17 β -estradiol. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 180 pp.
- Menni RC. (2004). Peces y ambientes en la Argentina continental. En: *Monografías del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, Vol. 5: 316 pp
- Menone ML, Aizpún de Moreno JE, Moreno VJ, Lanfranchi AL, Metcalfe TL, Metcalfe CD. (2001). Organochlorine pesticides and PCBs in a southern Atlantic coastal lagoon watershed, Argentina. *Arch Env Cont Toxicol* 40 (3): 355-362.
- Metcalfe TL, Metcalfe CD. (1997). The trophodynamics of PCBs, including mono- and non-ortho congeners, in the food web of North-Central Lake Ontario. *Sci Total Environ* 201: 245-272.
- Miglioranza KSB, Aizpún de Moreno JE, Moreno VJ. (2003). Dynamics of organochlorine pesticides in soils from a southeastern region of Argentina. *Environ Toxicol Chem* 22(4):712-717.
- Miglioranza KSB, Aizpún de Moreno JE, Moreno VJ. (2004). Organochlorine pesticides sequestered in the aquatic macrophyte *Schoenoplectus californicus* from a shallow lake in Argentina. *Water Res* 38 (7): 1765-1772.
- Mitchelmore CL y Rice CP. (2006). Correlations of nonylphenol-ethoxylates and nonylphenol with biomarkers of reproductive function in carp (*Cyprinus carpio*) from the Cuyahoga River. *Sci Total Environ* 371: 391-401.
- Momo F, Ventura A, Maccir T. (2003). Estado ecológico de la cuenca del río Luján. En: Alsina G (Ed). *Las aguas bajan turbias en la región metropolitana del Gran Buenos Aires*. Al Margen, Argentina, p 104-112.
- Monserrat JM, Martínez PE, Geracitano LA, Amado LL, Martínez Gaspar Martins C, Lopes Leães Pinho G, Soares Chaves I, Ferreira-Cravo M, Ventura-Lima J, Bianchini A. (2007). Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp Biochem Physiol* 146C: 221-234.

- Monserrat JM, Ventura Lima J, Ribas Ferreira JL, Acosta D, Longaray Garcia M, Baptista Ramos P, Barros Moraes T, dos Santos LC, Amado LL. (2008). Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). *Comp Biochem Physiol* 148 C: 287-292.
- Muniz P, Venturini N, Martínez A. (2002). Physico-chemical characteristics and pollutants of the benthic environment in the Montevideo coastal zone, Uruguay. *Mar Pollut Bull* 44: 962-968.
- Muniz P, Danulat E, Yannicelli B, García-Alonso J, Medina G, Bicego MC. (2004). Assessment of contamination by heavy metals and petroleum hydrocarbons in sediments of Montevideo Harbour (Uruguay). *Environ Int* 29: 1019-1028.
- Nagel R e Isberner K. (1998). Testing of chemicals with fish- a critical evaluation of tests with special regard to zebrafish. En: *Fish Ecotoxicology*. Braunbeck, D.E., Hinton, D.E. y Streit, B. Eds. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland. 337-342.
- Nahrgang J, Camus L, Broms F, Christiansen JS, Hop H. (2010). Seasonal baseline levels of physiological and biochemical parameters in polar cod (*Boreogadus saida*): Implications for environmental monitoring. *Mar Pollut Bull* 60: 1336-1345.
- Niencheski LF, Fillmann G. (2006). Contaminantes: Metais, Hidrocarbonetos e Organoclorados. En: Lana PC, Bianchini A, Ribeiro CAO, Niencheski LFH, Fillmann G, Santos CSG. (Eds.), *Avaliação Ambiental de Estuários Brasileiros: Diretrizes Metodológicas*. Museu Nacional, Rio de Janeiro, RJ. pp. 63-118.
- Nilsen BM, Berg K, Goksoyr A. (1998). Induction of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish. A biomarker of environmental pollution. En: Phillip IR y Shephard EA (Eds). *Methods in Molecular Biology*, Vol 107: Cytochrome P450 Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ. pp 423-438.
- O'Farrell I, Lombardo RJ, de Tezanos Pinto P, Loez C. (2002). The assessment of water quality in the Lower Luján River (Buenos Aires, Argentina): phytoplankton and algal bioassays. *Environ Pollut* 120: 207-218.
- Oakes KD, Van Der Kraak GJ. (2003). Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol* 63: 447-463
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 95: 351-358.
- Oikari A. (2006). Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants: review. *Aquat Toxicol* 78: 370-381.
- Ondarza PM. (2012). Fuentes terrestres de contaminación marina: Compuestos Organoclorados (COCs) en la cuenca del Río Negro, Patagonia Argentina. Tesis Doctoral. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (CONICET)-Universidad Nacional de Mar del Plata. Editorial Suarez, Mar del Plata, Argentina. 313 pp. ISBN: 978-897-1732-64-7.
- Ossana NA. (2011). Biomarcadores de contaminación acuática: estudios en los ríos Luján y Reconquista. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 206 pp.
- Ossana NA y Salibián A. (2013). Micronucleus test for monitoring the genotoxic potential of the surface water of Luján River (Argentina) using erythrocytes of *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Ecotoxicol Environ Contam* 8 (1): 67-74.

- Ozmen M, Gungordu A, Kucukbay FZ, Guler RE. (2006). Monitoring the effects of water pollution on *Cyprinus carpio* in Kara-kaya Dam Lake, Turkey. *Ecotoxicology* 15:157-169.
- Padrós J, Pelletier M, Reader S, Denizeau F. (2000). Mutual in vivo interactions between benzo(a)pyrene and tributyltin in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Environ Toxicol Chem* 19 (4): 1019-1027.
- Palace VP, Klaverkamp JF, Lockhart WL, Metner DA, Muir DCG, Brown SB. (1996). Mixed-function oxidase enzyme activity and oxidative stress in lake trout (*Salvelinus namaycush*) exposed to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB-126). *Environ Toxicol Chem* 15 (6): 955-960.
- Pandey S, Parvez S, Sayeed I, Haque R, Bin-Hafeez B, Raisuddin S. (2003). Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Sci Total Environ* 309: 105-115.
- Patel MR, Scheffler BE, Wang L, Willett KL. (2006). Effects of benzo(a)pyrene exposure on killifish (*Fundulus heteroclitus*) aromatase activities and mRNA. *Aquat Toxicol* 77 (3): 267-278.
- Peluso ML. (2011). Evaluación de efectos biológicos y biodisponibilidad de contaminantes en sedimentos del Río de la Plata y afluentes. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de La Plata. 178 pp.
- Peluso L, Bulus Rossini G, Salibián A, Ronco A. (2013). Physicochemical and ecotoxicological based assessment of bottom sediments from the Luján River basin, Buenos Aires, Argentina. *Environ Monit Assess*. 185: 5993-6002. DOI 10.1007/s10661-012-3000-7.
- Pérez Carrera E, García-López A, Martín del Río MP, Martínez-Rodríguez G, Solé M, Mancera JM. (2007). Effects of 17 β -estradiol and 4-nonylphenol on osmoregulation and hepatic enzymes in gilthead sea bream (*Sparus auratus*). *Com Biochem Physiol* 145C: 210-217.
- Pesce SF, Cazenave J, Monferrán MV, Frede S, Wunderlin DA. (2008). Integrated survey on toxic effects of lindane on neotropical fish: *Corydoras paleatus* and *Jenynsia multidentata*. *Environ Pollut* 156: 775-783.
- Petrovic M, Solé M, López de Alda MJ, Barceló D. (2002). Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environ Toxicol Chem* 21 (10): 2146-2156.
- Pizarro H y Alemanni ME. (2005). Variables físico-químicas del agua y su influencia en la biomasa del perifiton en un tramo inferior del Río Luján (Provincia de Buenos Aires). *Ecología Austral* 15:73-88.
- Porte C, Janer G, Lorusso LC, Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP, Fossi MC, Canesi L. (2006). Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. Review. *Com Biochem Physiol*. 143 C: 303-315.
- Pretto A, Loro VL, Menezes C, Silveira Moraes B, Boschmann Reimche G, Zanella R, de Ávila LA. (2011). Commercial formulation containing quinclorac and metsulfuron-methyl herbicides inhibit acetylcholinesterase and induce biochemical alterations in tissues of *Leporinus obtusidens*. *Ecotoxicol Environ Safe* 74: 336-341.
- Rand GM, Wells PG, McCarty LS. (1995). Introduction to Aquatic Toxicology. En: Rand GM (Ed). *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment*. Taylor & Francis, Washington DC.

- Rand GM. (2008). Fish Toxicity Studies. En: Di Giulio RT y Hinton DE (Eds). The Toxicology of Fishes. Taylor & Francis Group. NY, Boca Raton, FL, pp. 659-682.
- Readman JW, Fillmann G, Tolosa I, Bartocci J, Villeneuve JP, Catinni C, Mee LD. (2002). Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. Mar Pollut Bull. 44: 48-62.
- Reserva Natural Punta Lara. Reseña histórica, biológica y cultural. <http://www.reservapuntalara.com.ar/>
- Rey Vázquez G, Meijide FJ, Da Cuña RH, Lo Nostro FL, Piazza YG, Babay PA, Trudeau VL, Maggese MC, Guerrero GA. (2009). Exposure to waterborne 4-tert-octylphenol induces vitellogenin synthesis and disrupts testis morphology in the South American freshwater fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Com Biochem Physiol 150 C: 298-306.
- Richardson M. (1995). Chapter 1. En: Richardson, M. (Ed). Environmental Toxicology Assessment. Taylor & Francis, Washington, D.C.
- Richardson DM, Gubbins MJ, Davies IM, Moffat CF, Pollard PM. (2004). Effects of feeding status on biliary PAH metabolite and biliverdin concentrations in plaice (*Pleuronectes platessa*). Environ Toxicol Pharmacol 17: 79-85.
- Rigacci LN, Giorgi ADN, Vilches CS, Ossana NA, Salibián A. (2013). Effect of a reservoir in the water quality of the Reconquista River, Buenos Aires, Argentina. Environ Monit Assess. DOI 10.1007/s10661-013-3243-y.
- Ronco A, Peluso L, Jurado M, Rossini G, Salibián A. (2008). Screening of sediment pollution in tributaries from the southwestern coast of the Rio de la Plata estuary. Latin American Journal of Sedimentology and Basin Analysis 15: 67-75.
- Rossi A, Cazenave J, Bacchetta C, Ale A, Campana M, Parma MJ. (2012). Efectos bioquímicos y fisiológicos de la inanición en *Hoplosternum littorale* (Pisces, Callichthyidae). 5° Congreso Argentino de Limnología, Santa Fe.
- Rosso JJ. (2007). Peces pampeanos: guía y ecología. L.O.L.A (Ed). 224 pp.
- Rovedatti MG, Castañé PM, Topalián ML, Salibián A. (2001). Monitoring of organochlorine and organophosphorus pesticides in the water of the Reconquista River (Buenos Aires, Argentina). Wat Res 35 (14): 3457-3461.
- Salibián A. (2006). Ecotoxicological assessment of the highly polluted Reconquista river of Argentina. Rev. Environ Contam Toxicol 185: 35-65.
- Sánchez Caro A. (2010). Calidad del agua del río Luján. En Carballo CT, (Ed). Información ambiental de la cuenca del río Luján. Aportes para la gestión integral del agua, 1ª ed, Prometeo Libros, Luján, Buenos Aires, Argentina, pp 123-131.
- Sanchez W, Piccini B, Ditche JM, Porcher JM. (2008). Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring. Environ Int 34: 791-798.
- Sanchez W y Porcher JM. (2009). Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. Trends in Analytical Chemistry 28: 150-158.
- Santos de Souza A, Machado Torres JP, Ornellas Meire R, Curcio Neves R, Souto Couri M, Silveira Serejo C. (2008). Organochlorine pesticides (OCs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments and crabs (*Chasmagnathus granulata*, Dana, 1851) from mangroves of Guanabara Bay, Rio de Janeiro State, Brazil. Chemosphere 73:S186-S192.

- Scarcia P, de la Torre FR. (2008). Efectos de un hidrocarburo aromático policíclico (β -Naftoflavona) sobre biomarcadores de efecto en *Corydoras paleatus* en condiciones de campo y laboratorio. *Biología Acuática* 24: 131-136.
- Scarcia P, Calamante G, de la Torre F. (2012a). Biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*) and native collected fish (*Leporinus obtusidens*) in the Río de la Plata estuary, Argentina. *Environmental Toxicology* DOI: 10.1002/tox.21823.
- Scarcia P, Calamante G, de la Torre FR. (2012b). Responses of biomarkers of a standardized (*Cyprinus carpio*) and a native (*Pimelodella laticeps*) fish species after *in situ* exposure in a periurban zone of Luján River (Argentina). *Environ Toxicol* DOI: 10.1002/tox.21780.
- Schlenk D, Celander M, Gallagher EP, Stephen G, James M, Kullman SW, van der Hurk P, Willett K. (2008). Biotransformation in fishes. En: Di Giulio RT y Hinton, DE (Eds). *The toxicology of fishes* Taylor & Francis Group. NY, Boca Raton, FL, pp. 153-234.
- Schlezinger JJ, White RD, Stegeman JJ. (1999). Oxidative Inactivation of Cytochrome P-450 1A (CYP1A) Stimulated by 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl: Production of Reactive Oxygen by Vertebrate CYP1As. *Mol Pharmacol* 56:588–597
- Schlezinger JJ y Stegeman JJ. (2000). Induction of cytochrome P450 1A in the American Eel by model halogenated and non-halogenated aryl hydrocarbon receptor agonists. *Aquat Toxicol* 50: 375-386
- Schlezinger JJ y Stegeman JJ. (2001). Induction and suppression of cytochrome P450 1A by 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl and its relationship to oxidative stress in the marine fish scup (*Stenotomus chrysops*). *Aquat Toxicol* 52: 101-115.
- Schlezinger JJ, Struntz WDJ, Goldstone JV, Stegeman JJ. (2006). Uncoupling of cytochrome P450 1A and stimulation of reactive oxygen species production by co-planar polychlorinated biphenyl congeners. *Aquat Toxicol* 77: 422-432.
- Schmidt K, Staaks GBO, Pflugmacher S, Steinberg CEW. (2005). Impact of PCB mixture (Aroclor 1254) and TBT and a mixture of both on swimming behavior, body growth and enzymatic biotransformation activities (GST) of young carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat Toxicol* 71: 49-59.
- Schwaiger J, Mallow U, Ferling H, Knoerr S, Braunbeck Th, Kalbfus W, Negele RD. (2002). How estrogenic is nonylphenol? A transgenerational study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a test organism. *Aquat Toxicol* 59: 177-189.
- Serafim A, Company R, Lopes B, Fonseca VF, França S, Vasconcelos RP, Bebianno MJ, Cabral HN. (2012). Application of an integrated biomarker response index (IBR) to assess temporal variation of environmental quality in two Portuguese aquatic systems. *Ecol Indic.* 19: 215-225.
- Shang DY, Macdonald RW, Ikononou MG. (1999). Persistence of nonylphenol ethoxylate surfactants and their primary degradation products in sediments from near a Municipal Outfall in the Strait of Georgia, British Columbia, Canada. *Environ Sci Technol* 33: 1366-1372.
- Silveira Moraes B, Loro VL, Gluszcak L, Pretto A, Menezes C, Marchezan E, de Oliveira Machado S. (2007). Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere* 68: 1597-1601.
- Silveira Moraes B, Loro VL, Pretto A, Braga da Fonseca M, Menezes C, Marchesan E, Boschmann Reimche G, de Avila LA. (2009). Toxicological and metabolic parameters of the

- teleost fish (*Leporinus obtusidens*) in response to commercial herbicides containing clomazone and propanil. *Pestic Biochem Phy* 95: 57-62.
- Simonato JD, Guedes CLB, Martinez CBR. (2008). Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicol Environ Saf* 69: 112-120.
 - Sloof W, Van Kreijl CF, Baars AJ. (1983). Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquat Toxicol* 4: 1-14.
 - Smolders R, Bervoets L, Blust R. (2004). In situ and laboratory bioassays to evaluate the impact of effluent discharges on receiving aquatic ecosystems. *Environ Pollut* 132: 231-243.
 - Snyder EM, Synder SA, Kelly KL, Gross TS, Villeneuve DL, Fitzgerald SD, Villalobos SA, Giesy JP. (2004). Reproductive responses of Common Carp (*Cyprinus carpio*) exposed in cages to influent of the Las Vegas Wash in Lake Mead, Nevada, from late winter to early spring. *Environ Sci Technol* 38: 6385-6395.
 - Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester J. (2008). Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ Int* 34: 1033-1049.
 - Sojinu OS, Wang JZ, Sonibare OO, Zeng EY. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and soils from oil exploration areas of the Niger Delta, Nigeria. *J Hazard Mater* 174: 641-647.
 - Solé M, López de Alda MJ, Castillo M, Porte C, Ladegaard-Pedersen K, Barceló D. (2000). Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalanian Area (NE Spain). *Environ Sci Technol* 34: 5076-5083.
 - Song SB, Xu Y, Zhou BS. (2006). Effects of hexachlorobenzene on antioxidant status of liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere* 65: 699-706.
 - Souza IC, Duarte ID, Pimentel NQ, Rocha LD, Morozesk M, Bonomo MM, Azevedo VC, Pereira CDS, Monferrán MV, Milanez CRD, Matsumoto ST, Wunderlin DA, Fernandes MN. (2013). Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. *Environ Pollut* 180: 136-144.
 - Speranza ED, Colombo JC. (2009). Biochemical composition of a dominant detritivorous fish *Prochilodus lineatus* along pollution gradients in the Paraná-Río de la Plata Basin. *J Fish Biol* 74: 1226-1244.
 - Stanic B, Andric N, Zoric S, Grubor-Lajsic G, Kovacevic R. (2006). Assessing pollution in the Danube River near Novi Sad (Serbia) using several biomarkers in sterlet (*Acipenser ruthenus* L.). *Ecotoxicol Environ Saf* 65: 395-402.
 - Staples CA, Weeks J, Hall JF, Naylor CG. (1998). Evaluation of aquatic toxicity and bioaccumulation of C8-and C9-Alkylphenol Ethoxylates. *Environ Toxicol Chem* 17 (12): 2470-2480.
 - Straus DL, Schlenk D, Chambers JE. (2000). Hepatic microsomal desulfuration and dearylation of chlorpyrifos and parathion in fingerling channel catfish: lack of effect from Aroclor 1254. *Aquat Toxicol* 50: 141-149.

- Tejada-Vera R, López-López E, Sedeño-Díaz JE. (2007). Biomarkers and bioindicators of the health condition of *Ameioba splendens* and *Goodea atripinnis* (Pisces: Goodeidae) in the Ameca River, Mexico. *Environ Int* 33:521–531.
- Teles M, Pacheco M, Santos MA. (2005). *Sparus aurata* L. liver EROD and GST activities, plasma cortisol, lactate, glucose and erythrocytic nuclear anomalies following short-term exposure either to 17 β -estradiol (E2) or E2 combined with 4-nonylphenol. *Sci Total Environ* 336: 57-69.
- Torres MA, Barros MP, Campos SCG, Pinto E, Rajamani S, Sayre RT, Colepicolo P. (2008). Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicol Environ Saf* 71:1-15.
- Toyama T, Murashita M, Kobayashi K, Kikuchi S, Sei K, Tanaka Y, Ike M, Mori K. (2011). Acceleration of nonylphenol and 4-tert-octylphenol degradation in sediment by *Phragmites australis* and associated rhizosphere bacteria. *Environ Sci Technol* 45: 6524-6530.
- Uguz C, Iscan M, Erguven A, Isgor B, Togan I. (2003). The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effect on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Environ Res* 92: 262-270.
- Vaccaro E, Meucci V, Intorre L, Soldani G, Di Bello D, Longo V, Gervasi PG, Pretti C. (2005). Effects of 17 β -estradiol, 4-nonylphenol and PCB 126 on the estrogenic activity and phase 1 and 2 biotransformation enzymes in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat Toxicol* 75: 293-305.
- van den Hurk P. (2006). Bile fluorescence, heme oxygenase induction, and increased biliverdin excretion by mixtures of environmental toxicants. *Aquat Toxicol* 77: 202–209.
- van der Oost R, Lopes SCC, Komen H, Satumalay K, van den Bos R, Heida H, Vermeulen NPE. (1998). Assessment of environmental quality and Inland water pollution using biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*): use of a bioactivation: detoxication ratio as a biotransformation index (BTI). *Mar Environ Res* 46: 315-319.
- van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13 (2): 57-149.
- van Gestel CAM y van Brummelen T.C. (1996). Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5: 217-225.
- van Schanke A, Boon JP, Aardoom Y, van Leest A, van Schooten FJ, Maas L, van den Berg M, Everaarts JM. (2000). Effect of a dioxin-like PCB (CB 126) on the biotransformation and genotoxicity of benzo[a]pyrene in the marine flatfish dab (*Limanda limanda*). *Aquat Toxicol* 50: 403-415.
- Van Veld PA y Nacci DE. (2008). Toxicity resistance. En: Di Giulio RT, Hinton, D. (Eds.). *The toxicology of fishes*. Taylor & Francis Group, NY, Boca Raton, FL, pp. 597-641.
- Vane CH, Harrison I, Kim AW. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments from the Mersey Estuary, U.K. *Sci Total Environ* 374: 112- 126.
- Vazquez-Duhalt R, Marquez-Rocha F, Ponce E, Licea AF, Viana MT. (2005) Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Scientific Review. Appl Ecol Env Res* 4(1): 1-25.
- Vega-López A, Galar-Martínez M, Jiménez-Orozco FA, García-Latorre E, Domínguez-López ML. (2007). Gender related differences in the oxidative stress response to PCB exposure in an endangered goodeid fish (*Girardinichthys viviparus*). *Comp Biochem Physiol* 146 A: 672- 678.

- Vega-López A, Jiménez-Orozco FA, García-Latorre E, Domínguez-López ML. (2008). Oxidative stress response in an endangered goodeid fish (*Girardinichthys viviparus*) by exposure to water from its extant localities. *Ecotoxicol Environ Saf* 71: 94-103.
- Vieira LR, Sousa A, Frasco MF, Lima I, Morgado F, Guilhermino L. (2008). Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Sci Tot Environ* 395: 87-100.
- Washburn BS, Vines CA, Baden DG, Hinton DE, Walsh PJ. (1996). Differential effect of brevetoxin and β -naphthoflavone on xenobiotic metabolizing enzymes in striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquat Toxicol* 35: 1-10.
- White RD, Shea D, Solow AR, Stegeman JJ. (1997). Induction and Post-Transcriptional Suppression of Hepatic Cytochrome P450 1A1 by 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl. *Biochem Pharmacol* 53: 1029-1040.
- WHO (World Health Organization). (1993). Biomarkers and risk assessment concepts and principles. *Environmental Health Criteria* 155. Geneva.
- Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol* 30 (4): 347-570.
- Winemiller KO. (1987). Feeding and reproductive biology of the curruto, *Hoplosternum littorale*, in the Venezuelan llanos with comments on the possible function of the enlarged male pectoral spines. *Environ Biol Fish* 20 (3): 219-227.
- Yang X, Baumann PC. (2006). Biliary PAH metabolites and the hepatosomatic index of brown bullheads from Lake Erie tributaries. *Ecol Indic.* 6: 567-574.
- Ying GG, Williams B, Kookana R. (2002). Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review. *Environ Int* 28: 215-226.
- Zar JH. (1996). *Biostatistical Analysis*, Prentice Hall, N. J. 662 pp.
- Zhou HY y Wong MH. (2000). Accumulation of sediment-sorbed PCBs in Tilapia. *Wat Res* 34 (11): 2905-2914.