

**Ecofisiología
y Ecotoxicología**

Espina, S., y C. Vanegas, 2005. Ecofisiología y contaminación, p. 53-78. In: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 p.

Ecofisiología y Contaminación

Sonia Espina y Cecilia Vanegas

Facultad de Ciencias, UNAM

3

RESUMEN

Para entender el efecto de los contaminantes sobre el individuo, es fundamental conocer sus respuestas en el medio no alterado por los contaminantes. Así, una forma operativa de aproximarse al problema es a través de estudios ecofisiológicos en los cuales se utilizan las claves interpretativas de la fisiología para explicar las respuestas del organismo en función de las variables ambientales, incluidos los contaminantes. Debido a que los criterios para seleccionar las respuestas de los organismos son numerosas y variadas, se mencionan los diferentes puntos de vista acerca de cómo abordar los efectos de la contaminación sobre los organismos; se señalan las ventajas y limitaciones de las pruebas de toxicidad a corto plazo o agudas y de largo plazo o crónicas. Asimismo, se enfatiza la influencia de los factores del medio para poder detectar la acción tóxica de los contaminantes o sus efectos subletales. La selección de las pruebas a realizar, así como también las respuestas a evaluar, dependerá del nivel de organización biológica que se aborde, considerando dicho nivel dentro del continuo del mundo biológico que va desde las moléculas hasta el ecosistema. Ante el problema de la contaminación del Golfo de México, se enfatiza la necesidad de aunar esfuerzos de investigadores en diversas áreas de especialización, de manera que estudios interdisciplinarios conduzcan al conocimiento del problema y a la búsqueda de mejores alternativas de solución.

ABSTRACT

In order to understand the effects of pollutants on organisms, we must know first the individual responses in a pollutant-free media. Thus, an operating form to approach this problem is through ecophysiological studies, which use the physiological clues to explain the different organismic responses. In this Chapter, several points of view to understand the pollution effects on organisms are mentioned and their advantages, as well as the limitations of the short (acute) and long term (chronic) toxicity test are indicated. Also, the influence of environmental factors to detect the toxic action of pollutants and their sublethal effects are emphasized. Both, the selection of the test to be accomplished and the responses to be evaluated, depend on the level of biological organization from molecules to ecosystems. Thus, to face the pollution problems in the Gulf of Mexico coasts, it is necessary to conduct multidisciplinary studies to reach the best solution alternatives.

INTRODUCCIÓN

El Golfo de México, como la mayoría de los mares de la tierra esta contaminado. Los asentamientos humanos y las diversas actividades que el hombre desarrolla tanto en la tierra como en el mar, influyen negativamente sobre el agua, las playas y los recursos naturales (Fig. 1). Asimismo, los desechos industriales penetran directamente al ambiente marino a través de los ríos.

Por la circulación oceánica que a gran escala se presenta en el Golfo de México, la contaminación generada en algún lugar se reflejará necesariamente primero en las regiones aledañas y luego en la totalidad de este sistema semicerrado que compartimos tres países, lo cual le da un carácter internacional al problema de la región.

La inquietud que suscita el problema de la contaminación marina, se refleja ampliamente en la definición propuesta por los expertos de las Naciones Unidas (GESAMP, 1980):

“Contaminación es la introducción de sustancias y de energía hecha por el hombre en el ambiente marino, lo cual resulta perjudicial para los recursos vivos, constituye un riesgo para la salud humana, perjudica las actividades marinas como la pesca, daña la calidad del agua de mar y reduce las actividades de recreo”.

Sin embargo, existen numerosas y controvertidas opiniones respecto a como se debería enfocar el problema de la contaminación en un sistema receptor, como el ambiente marino.

Tal vez las discrepancias principales sean reflejo de las diferentes formas de abordar las denominadas jerarquías o niveles de organización biológica (Mann, 1982). Por una parte se afirma que es fundamental la interpretación ecológica y que se debe pensar en el sistema integral más que en una especie o en alguna actividad (Yáñez-Arancibia, 1996). Sin embargo, también se reconocen como significativas

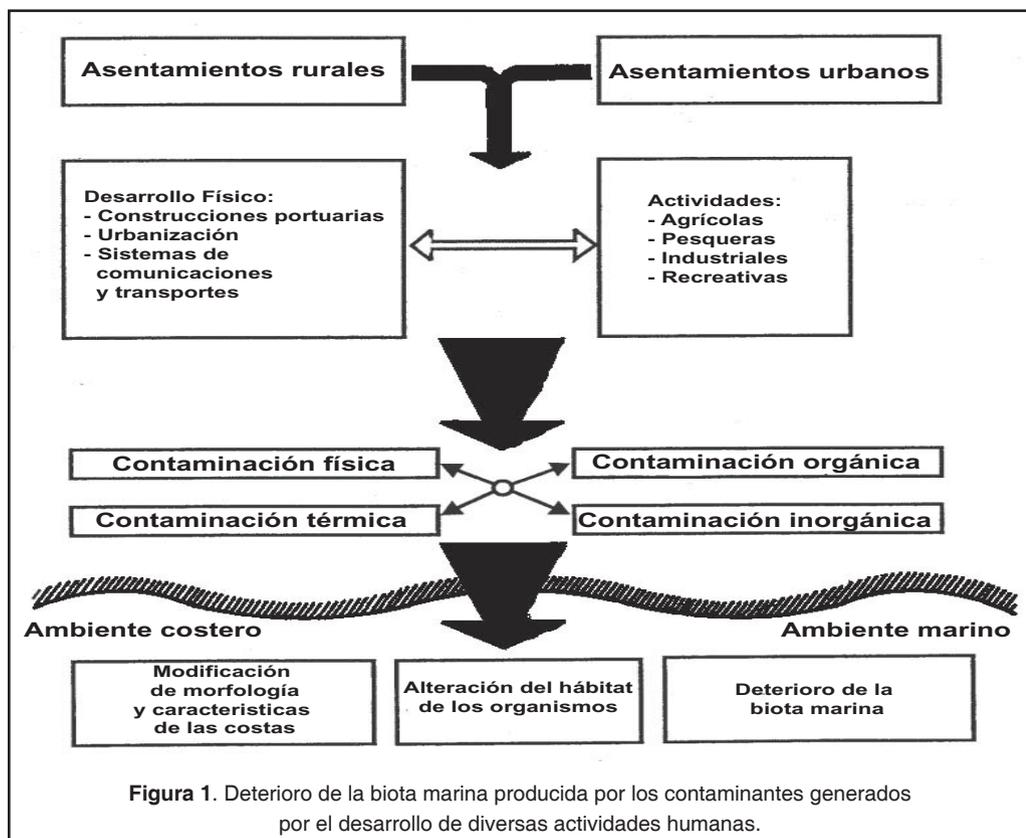


Figura 1. Deterioro de la biota marina producida por los contaminantes generados por el desarrollo de diversas actividades humanas.

las mediciones hechas a otros niveles de organización. Por ejemplo, en trabajos realizados en mesocosmos, se pone énfasis en el hecho que se eligió el trabajo a nivel población con el fin de establecer un vínculo entre los niveles inferiores (organismo y suborganismo) con los superiores, como las poblaciones y comunidades; también se reconoce que las variables de la comunidad sirven como indicadores de la contaminación, de amplio espectro (Underwood y Peterson, 1988).

Así por una parte, consideraciones hechas con criterio amplio, reconocen que los efectos medidos a niveles altos de organización biológica (población, comunidad) son más significativos ecológicamente pero a la vez insensibles e inespecíficos, mientras que por la otra, se reconoce que los efectos producidos por los contaminantes y su medición en los niveles de organización bajos (suborganismo) son más sensibles y específicos, pero menos significativos ecológicamente (GESAMP, 1980).

En este marco de referencia, el grupo de expertos de las Naciones Unidas, considera que se podrían llevar a cabo hasta 36 mediciones dentro de los distintos niveles de organización biológica, y en cada nivel establecen tres prioridades. Dentro de las 20 mediciones incluidas en la primera categoría, el porcentaje de las del tipo ecológico (35%), es ligeramente mayor que las fisiológicas (25%) y que las morfológicas (25%). Las mediciones bioquímicas recomendadas representan el 10% de esta ordenación y se sugiere que no se hagan aisladas sino en conjunto con las variables fisiológicas. El 5%

restante se refiere a las pruebas denominadas bioensayos (Fig. 2). Por su parte, los químicos ambientales prefieren el uso de los análisis químicos a los criterios biológicos, debido a la gran variabilidad de los sistemas naturales y a la extraordinaria complejidad de las reacciones de los organismos, aunque reconocen ampliamente que estos son indispensables en las etapas de evaluación (GESAMP, 1980).

Al respecto, es evidente que los estudios de contaminación ambiental no se pueden basar únicamente en los aspectos químicos ya que si se toma en cuenta la definición misma del concepto, la química ambiental y el organismo son un par insoluble. Asimismo, las respuestas biológicas sin datos fisicoquímicos del medio contienen muy poca información.

Howell (1976) estima que la simple detección de sustancias químicas ambientales es irrelevante, ya que muchas sustancias están naturalmente presentes y que además pueden desempeñar papeles esenciales en la biota marina; solo adquieren la categoría de contaminantes cuando se encuentran en lugares o concentraciones inadecuados, lo cual se traduce en efectos deletéreos para ciertos organismos y afecta al sistema (Freedman, 1989).

Durante bastante tiempo las mediciones de toxicidad se basaron solo en los análisis químicos. Las pruebas de toxicidad pusieron en evidencia lo inadecuado de tales procedimientos aislados, aunque se reconoce que éstas no reflejan la variabilidad de los sistemas naturales ni la complejidad inherente a los mismos y por

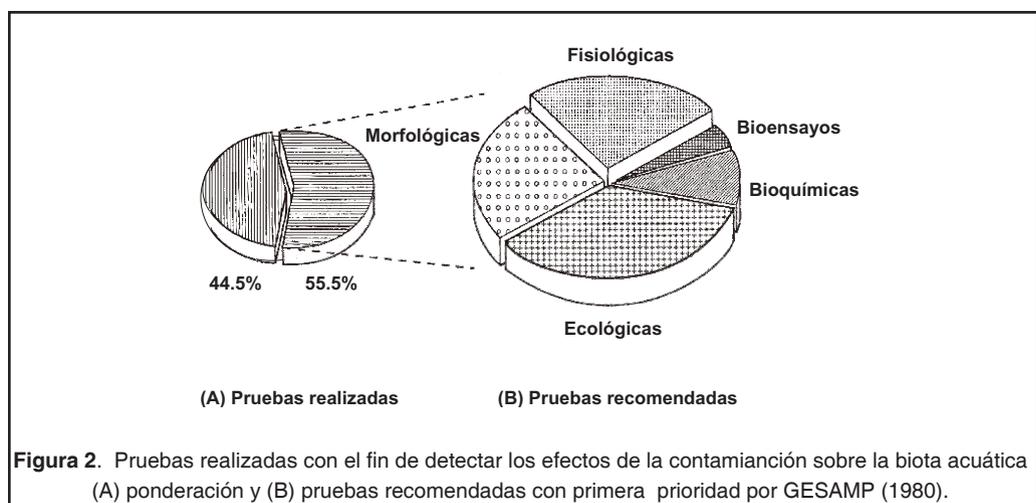


Figura 2. Pruebas realizadas con el fin de detectar los efectos de la contaminación sobre la biota acuática (A) ponderación y (B) pruebas recomendadas con primera prioridad por GESAMP (1980).

tanto no producen información útil para el manejo del sistema (Cairns, 1982, Cairns y van der Schalie, 1982).

Otros autores opinan que las pruebas de toxicidad pueden ser utilizadas para predecir el efecto de los desechos sobre el ambiente, para comparar efectos tóxicos en animales diversos o bajo condiciones de prueba diferentes y para regular las descargas de contaminantes en un cuerpo de agua receptor. Sin embargo, no sirven para todos estos fines con la misma efectividad.

Las pruebas de toxicidad "se realizan con el fin de medir el grado de respuesta producido en función de la concentración de una sustancia química", en tanto que los bioensayos "son pruebas para evaluar la potencia relativa de una sustancia química sobre un tejido vivo, organismo o grupo de organismos" y no para estimar la concentración de dicha sustancia tóxica (Rand y Petrocelli, 1985; Gutiérrez-Galindo, 1989). Por ello han sido caracterizadas como pruebas muy útiles, defendibles desde el punto de vista científico y legal y ecológicamente importantes (Buikema *et al.*, 1982).

Los dos criterios principales de toxicidad son: de corto plazo o agudos y de largo plazo o crónicos. Las pruebas basadas en el corto plazo proporcionan información acerca de la letalidad en relación a la concentración de los contaminantes; las pruebas basadas en el largo plazo sirven para medir respuestas como la sobrevivencia, el campo de crecimiento, el éxito reproductivo y la concentración tóxica aceptable; concentraciones mayores producen cambios irreversibles de las funciones vitales de un organismo (Patin, 1982).

Los efectos letales provocados por exposiciones agudas, pueden ocurrir en el medio natural ya que en casos de accidentes existe la posibilidad que los materiales tóxicos dañen directamente las poblaciones individuales y las comunidades, al alterar las principales funciones de los organismos lo que ocasionaría eventualmente, problemas en el ecosistema completo.

Los efectos subletales ocurren a bajas concentraciones del contaminante y son menos evidentes, aunque no menos significativas. Se ha encontrado en estudios efectuados, en el

campo, que existe correlación entre el nivel de concentración y la distribución de la biomasa y de la productividad de los ecosistemas (Weber, 1981; Patin, 1982).

Lo anterior permite distinguir dos enfoques diferentes en relación a los estudios de la contaminación. Esto es, los que se realizan en el campo y los que se efectúan en el laboratorio. Los experimentos de laboratorio pueden seguir cualquiera de los criterios señalados; pueden durar horas, días, (generalmente cuatro), o meses. Se pueden realizar con una especie, con más de dos en forma aislada o con muchas como el micro y mesocosmos. Estos experimentos tienen el propósito de acercarse cada vez más a las condiciones imperantes en el medio natural. Las implicaciones que se pueden derivar de las pruebas crónicas pueden llegar hasta el hombre, cuando se miden respuestas de bioacumulación, complementarias a las pruebas de toxicidad.

Aunque las pruebas de laboratorio son más fáciles de instrumentar, no están exentas de fallas. Se cometen errores, cuando no se toma en cuenta que los factores del medio modifican las respuestas de los organismos y que estos tienen capacidad de compensar y poseen mecanismos de detoxificación.

Tales desaciertos han sido mencionados en la literatura recientemente, por ejemplo al no tomar en cuenta que bajos niveles de oxígeno disueltos estimulan la respuesta respiratoria de los peces e indirectamente la toxicidad de los contaminantes, puesto que en tales circunstancias son captados del medio con mayor eficiencia. En este caso, las condiciones de hipoxia en los tejidos aunado a las altas concentraciones del tóxico en el interior del animal, serían las causas de la muerte y no la concentración medida del contaminante.

En el mismo sentido, la alta temperatura acelera las respuestas de detoxificación en crustáceos y moluscos, a la vez que pequeñas variaciones en la temperatura interfieren con el proceso de recuperación de las metalotioneínas en los análisis respectivos, en caso que sea éste el mecanismo de respuesta ante los contaminantes (White y Rainbow, 1986; Zanders, 1989).

Otro ejemplo en relación con la contaminación por metales pesados son los estudios que se presentan en la literatura donde no se precisa la forma química en que se encuentran, ni las interacciones entre ellos, o en los cuales se desconocen las interferencias que ocurren con los metales que son constituyentes naturales del agua de mar (Zanders, 1989).

También es necesario resaltar la importancia de la salinidad; este factor ejerce una notable influencia sobre varias respuestas de los organismos, a la vez que interfieren en los análisis químicos.

Por ello, es necesario enfatizar la influencia de los factores del medio para poder detectar la acción tóxica de los contaminantes o sus efectos subletales. Esto es crítico en experimentos a largo plazo, donde existe la posibilidad que los organismos expuestos a concentraciones subtóxicas, se adapten o se aclimaten dependiendo de la extensión de su ciclo de vida y del tiempo contemplado de prueba. En este sentido, es necesario comprender también la correlación entre los contaminantes y el modo de respuesta desplegado por los especímenes, con el fin de explicar lo que realmente ocurre.

En los experimentos denominados de micro y mesocosmos se investiga el efecto combinado de contaminantes a varias concentraciones, sobre las características estructurales y funcionales de comunidades marinas. A través de ellos se intenta reproducir las condiciones naturales lo más cercanamente posible, con el objeto de comprender los mecanismos mediante los cuales el hombre perturba su homeostasis (Patin, 1982). Es un compromiso entre el experimento de laboratorio donde se controlan todas las variables menos la que interesa y la pérdida de la precisión que significa el hecho de no confrontarlas. El ensamblaje de organismos en el mesocosmos difiere de los del campo debido a que las tasas de reproducción y de reclutamiento son distintas (Undewood y Peterson, 1988).

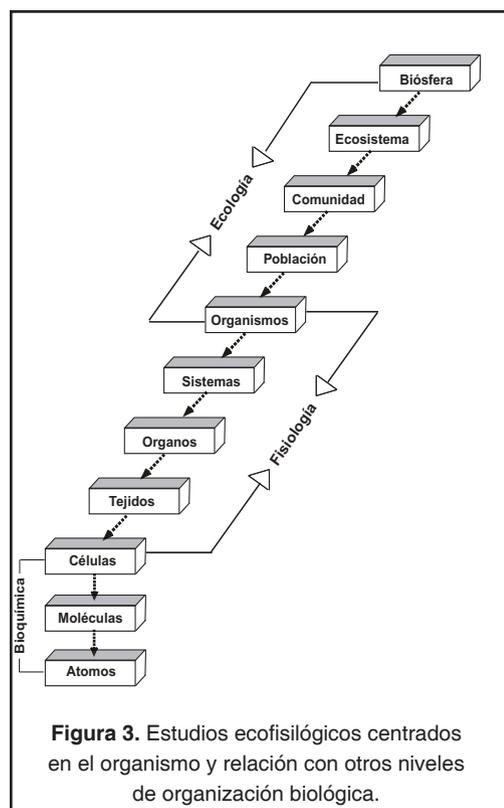
Los trabajos de campo tienen el propósito de investigar la acción de los contaminantes sobre los procesos que operan en el ecosistema. En otras palabras, se trata de determinar la integridad biológica de este en cuanto a la estructura y función para luego compararla con otro que

se encuentre, temporal o espacialmente, más lejos de la influencia de los contaminantes.

Todo lo anterior hace evidente la existencia de numerosos y frecuentemente discrepantes criterios sobre la forma de abordar el problema de la contaminación. A veces esto resulta confuso ya que parece ser de consenso general que también existe, en el mundo biológico, un continuo desde las moléculas al ecosistema en cuanto al efecto de los contaminantes. Por lo tanto la selección de las pruebas que se intenten llevar a cabo dependerán de la parte de este continuo que se aborde, a partir de las células, ya sea en experimentos de laboratorio o de campo.

También hace notorias las numerosas dificultades sobre la forma de enfocar los diferentes niveles de organización biológica. Esto es evidente cuando se niega o se acepta que las respuestas de los organismos o de los niveles superiores, pueden ser explicadas por lo que ocurre a niveles de jerarquía más bajos (Fig. 3). Lo anterior, es reflejo del compromiso que cada investigador tiene con su campo; el bioquímico defenderá su enfoque con el mismo énfasis con que el ecofisiólogo lo refutará o el ecólogo lo hará con ambos, todos con sólidos argumentos. Considerando la diversidad y número de los problemas y teniendo en cuenta que existe una gran variedad de áreas de especialización entre los investigadores interesados en el tema de la contaminación marina, sería realmente fructífero que la tarea se acometiera en un marco multidisciplinario. Según Hughes (1976) esto es posible, aunque se requiere tolerancia y comprensión de los puntos de vista que sustentan cada uno. En cuanto a la estrategia del trabajo; los químicos y los biólogos deberían sumar sus esfuerzos, ya que un estudio de contaminación, precisa contener medidas exactas de las condiciones ambientales. Incluidos los contaminantes, así como una evaluación de los efectos biológicos de dichas sustancias.

En lo que concierne a los efectos de la contaminación ambiental sobre los organismos y los ecosistemas es estimulante reconocer que en la actualidad existen estudios en los que se ha podido establecer relaciones cuantitativas entre experimentos de laboratorio y de campo y entre diferentes niveles de organización biológica, sub-organismo-organismo-población; también



que se haya planteado modelos con capacidad predictiva hacia niveles jerárquicos superiores (De Kruijt, 1991).

Anteriormente, la mayor parte de los trabajos fisiológicos se orientaban solo a la comprensión de los mecanismos y procesos esenciales subyacentes a las respuestas más complejas de los organismos. Tales estudios, en muchos casos, apoyaron el desarrollo de la ecotoxicología. Koeman (1991) destaca que el progreso en este campo ha dependido en gran medida, de los avances en las ciencias fisiológicas incluidas las áreas de especialización bioquímica, fisiopatología, endocrinología, neurofisiología, histopatología e inmunología. Frecuentemente, señala, la fisiología se beneficia con los avances de la toxicología en la medida que el estudio de las propiedades de las sustancias químicas, proporciona una comprensión más profunda sobre los mecanismos constituyentes de los procesos fisiológicos. Por su parte, la ecofisiología también tiene una estrecha relación con la ecotoxicología.

La fisiología ambiental o fisiología ecológica, denominada recientemente ecofisiología, fue

reconocida como una área autónoma dentro de la biología en la década de los años setenta (Ferrero, 1985). La aplicación que pueden tener los estudios ecofisiológicos en las investigaciones sobre el impacto ambiental de los contaminantes, está implícita en la propia definición:

“Ecofisiología es el estudio de la interrelación entre el organismo y el ambiente que lo rodea. En dicho estudio se busca la explicación de las respuestas del organismo a niveles inferiores de organización biológica (sistemas, órganos, tejidos, células, moléculas) y la proyección, en los niveles jerárquicos mayores (población, comunidad, ecosistema)”.

En esta definición es patente la relación de la ecofisiología con varios campos de la biología como el bioquímico, el fisiológico y el ecológico. Sin embargo, es importante precisar que los estudios ecofisiológicos se centran principalmente en el nivel organismo (Fig. 3).

La trascendencia de los estudios con este enfoque, hacia los niveles más altos de organización biológica, se manifiesta en el análisis de la distribución y la abundancia de los organismos en el ecosistema, en función de sus requerimientos fisiológicos. Según Calow y Sibly (1990), lo anterior queda explícito en la Ley de Tolerancia de Shelford, que se refiere a conceptos tales como el de factores limitantes y el de nicho multidimensional.

De aquí se desprende que cualquier factor o conjunto de factores, que favorezcan la expresión fisiológica óptima, se traducirá en los parámetros ecológicos tales como la distribución, la abundancia y la diversidad (Fry, 1974, 1971; Odum, 1953; Hutchinson y Maness, 1979). También, las condiciones ambientales extremas, se manifiestan en la diversidad (Newell, 1978; Vernberg y Vernberg, 1981).

Se piensa que en el futuro, el nexo entre la ecofisiología y la ecotoxicología será estrecho. Las investigaciones sobre los aspectos funcionales de organismos acuáticos diferentes proporcionarán conocimientos esenciales para identificar las especies más sensibles a los compuestos xenobióticos. Así, Koeman (1991) sugiere como una línea de acción importante, la caracterización de los organismos

en este contexto y sus respuestas como "marcadores biológicos de efecto y susceptibilidad". Denomina marcadores biológicos de efecto a cualquier cambio en las respuestas, cualitativo o cuantitativo, que indique deterioro en la integridad del organismo y por marcadores biológicos de susceptibilidad, se refiere a las respuestas fisiológicas determinadas genéticamente; en ambos casos el estímulo lo proporcionan las fluctuaciones adversas de los factores ambientales.

La trascendencia de tales estudios es evidente, ya que se podría explicar y predecir las respuestas de los especímenes observadas en el campo, con base en los datos obtenidos en el laboratorio, a la vez que sería posible identificar las especies más vulnerables ante cambios tales como la disminución del oxígeno disuelto, el ascenso o descenso de la temperatura y también la especies más propensas a contraer enfermedades (Koeman, 1991).

En el medio acuático, los organismos viven en condiciones permanentemente cambiantes, por lo que en general, se encuentran impactados por los cambios bruscos de los factores físicos y químicos a los que se suman concentraciones bajas de contaminantes, tanto naturales como antropogénicos. En conjunto estos factores imponen un estrés considerable en los mecanismos homeostáticos. Si el estrés es severo, se traducirá en limitaciones en la capacidad del organismo de manera directa o indirectamente a través del aumento de la sensibilidad a patógenos. En el siguiente nivel, se manifestará en disminución del éxito reproductivo y reducción global de la población.

Esta información es esencial en los estudios ecotoxicológicos. Hace más de un década, va-

rios autores destacaron la importancia de conocer la capacidad de los organismos (peces) para enfrentar el efecto deletéreo de los estresores ambientales, a la vez que propusieron diversos métodos para cuantificar el estrés (Eddy, 1981; Schreck, 1981; Wedemeyer y McLeay, 1981). Recientemente, los especialistas en diferentes campos pertinentes al tema de la contaminación han seleccionado diversas respuestas de los organismos en el medio alterado, como indicadores biológicos. Dichas respuestas aisladas o bien integradas en ciertos índices, pertenecen a diferentes niveles de organización (Thomas, 1990, Hinton y Lauren, 1990; Schreck, 1990; Widdows y Donkin, 1991).

En este capítulo se hace referencia a las respuestas del organismo ante el medio fluctuante. En ausencia de xenobióticos, con el fin de destacar la gran variabilidad natural de las mismas. Se toma en cuenta que ningún nivel de la jerarquía biológica es más importante que otro ya que el organismo responde de manera integrada a los factores del medio, los que a su vez actúan en conjunto. Así, se intenta establecer la influencia de diversos factores seleccionados sobre las variables biológicas, ya que esto es básico para la ecotoxicología. Antes que alguna variable sea utilizada como indicadora de las perturbaciones ambientales es indispensable conocer sus límites "naturales" y su trascendencia hacia jerarquías ecológicas. Por ello se considera que el enfoque ecofisiológico de la contaminación permitirá disponer de un amplio espectro de sensibilidad para analizar los diferentes aspectos de la contaminación en el Golfo de México.

La relación organismo-ambiente es parte integral del propio concepto de ecofisiología.

INTERACCIONES ORGANISMO-AMBIENTE

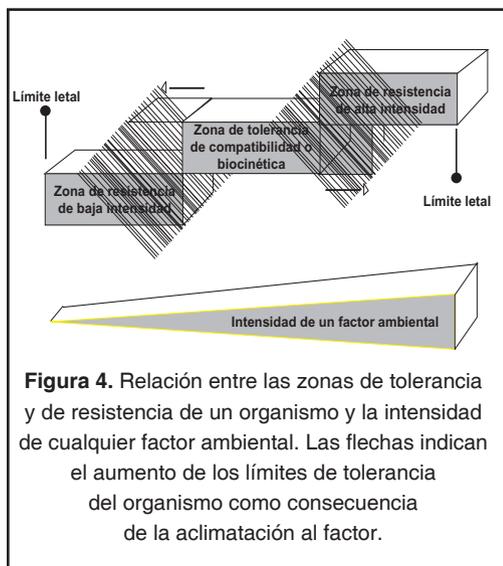
Bartholomew (1972) define al organismo como "un sistema dinámico, delicado, pero altamente adaptable que, en tanto permanezca vivo, existe en un continuo intercambio de energía con el ambiente que lo rodea" y agrega, "estamos forzados a concluir, como lo hiciera Claude Bernard hace más de un siglo, que el organismo y el ambiente forman un par inseparable". Este sistema está compuesto por unidades di-

ferentes altamente integradas, estrechamente reguladas y controladas, que evolucionan como un todo (Townsend y Calow, 1981).

El ambiente, se define como la suma total de muchos factores (Vernberg y Vernberg, 1981), comprende un conjunto de variables tanto físicas y químicas como biológicas, por lo tanto, la interrelación entre el ambiente y el organismo

es extremadamente compleja ya que este responde globalmente a las fluctuaciones del medio, es decir, a los cambios que ocurren en un ciclo diurno a corto plazo y a través de las estaciones del año a largo plazo. Por ejemplo, la temperatura varía de esta manera en diferentes hábitats. Frente a tales variaciones los organismos presentan compensaciones fisiológicas medibles. La resistencia al calor de los vertebrados acuáticos es una pauta; típicamente es más alta en ciertos periodos durante el verano y el otoño que en invierno (Layne *et al.*, 1987).

En un gradiente del complejo ambiental el organismo es capaz de vivir indefinidamente en un cierto intervalo; fuera de este, hacia ambos extremos, puede sobrevivir solo por un lapso de terminado. A la primera de estas porciones se denomina zona de compatibilidad, de tolerancia o de capacidad de adaptación; a las porciones extremas del gradiente se les conoce como zona de resistencia o letales (Fig. 4). En estas últimas, el equilibrio dinámico establecido el organismo y el medio se rompe y sobreviene la muerte.



El termino adaptación se refiere a cualquier característica del individuo que facilite y estimule la capacidad para sobrevivir y reproducirse en un ambiente particular (Hochachka y Somero, 1973). La zona de capacidad de adaptación está determinada genéticamente. Esto se refiere a la información contenida en el ge-

noma, la cual permite al organismo utilizar los mecanismos bioquímicos necesarios por enfrentar los cambios que ocurren en el medio.

Los límites de las zonas de resistencia son por una parte la zona de tolerancia, y por otra los límites letales superior e inferior en los cuales la intensidad del factor provoca la muerte del organismo (Fig. 4). En las zonas de resistencia, los animales aun cuando están estresados, son capaces de tolerar las influencias ambientales adversas aunque solo pueden hacerlo dentro de ciertos márgenes que dependen de la capacidad del organismo, de la intensidad del factor y del tiempo de exposición.

Los organismos despliegan otro tipo de respuestas que afectan solo al fenotipo. Estas se denominan aclimatación y aclimatación. La primera puede ocurrir en el lapso de la vida del organismo en el medio natural, donde muchos factores actúan en concierto. La segunda es a corto plazo e inducidas en el laboratorio al variar solo un factor particular del medio (Bowler, 1963; Newell, 1978; Prosser, 1991).

Se conoce que la aclimatación modifica los límites de tolerancia. Con respecto a la temperatura, varios autores mencionan que la aclimatación condiciona de tal manera al animal, que puede tolerar niveles que serían deletéreos por encontrarse fuera de la zona de tolerancia (Fig. 4). En dichos intervalos la temperatura impone fronteras a la tasa metabólica dentro de las cuales los organismos pueden ejercer sus funciones eficientemente.

Se ha comprobado que la aclimatación a las temperaturas altas o bajas aumenta el límite letal superior y disminuye el límite letal inferior, en los juveniles de *Metapenaeus bennettiae*. Asimismo, los límites letales de la especie a la salinidad pueden aumentar o disminuir cuando los animales se aclimatan a salinidades altas o bajas respectivamente. En cuanto a la interacción de la salinidad y de la temperatura, se ha observado que este último factor es el más importante ya que la aclimatación a la temperatura influye tanto sobre las temperaturas, como sobre las salinidades letales. En cambio la aclimatación a la salinidad no afecta los límites letales de temperatura (Aziz y Greenwood, 1981).

Los autores citan que en otras especies de crustáceos (*Penaeus aztecus* y *Gammarus duebeni*) el intervalo más amplio de tolerancia a la salinidad se presenta cuando los animales se aclimatan a la temperatura óptima, mientras que algunas temperaturas superiores o inferiores a la óptima, pueden subir el límite letal inferior de salinidad o bajar el límite superior, con lo cual se reduce la zona de resistencia de los especímenes a dicho factor.

Las características inherentes al individuo, tales como el estado de desarrollo, la edad, el tamaño y el sexo también modifican la zona de tolerancia a los factores ambientales (Fig. 5). La presencia de otros organismos pueden influir el comportamiento de los animales en el medio natural.

Anteriormente se menciona que los organismos tienen la capacidad de enfrentar, hasta cierto punto, el efecto adverso de estresores ambientales, debido a que poseen mecanismos de resistencia. Mientras se encuentran en la zona de resistencia ante un factor particular, el organismo estará estresado hasta que pueda escapar o bien disminuya o aumente la intensidad del factor según sea el caso. No solo es importante evaluar la aparición del estrés y el progreso de este, sino también su desaparición ya que en todo momento se requieren ajustes fisiológicos que precisan energía. Eddy (1981) destaca que esto es particularmente importante cuando los peces, por ejemplo, están sometidos a un estresor en forma periódica o intermitente. Brett (1958) define estrés como "un estado producido por cualquier factor am-

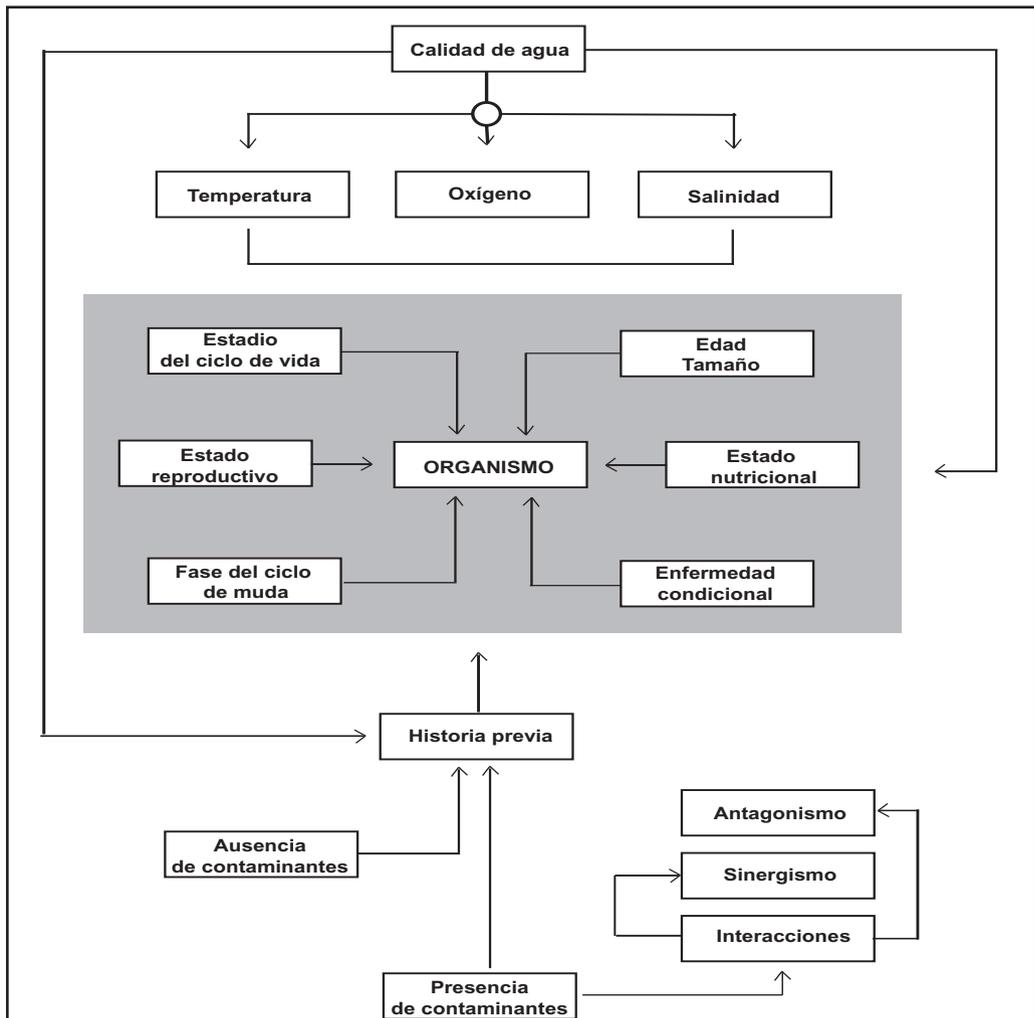


Figura 5. Factores intrínsecos y extrínsecos que modifican las respuestas fisiológicas de los organismos. Los contaminantes se incluyen entre los factores ambientales.

biental que extiende las respuestas adaptativas naturales de un animal o que perturba su funcionamiento normal a tal extremo que sus oportunidades de sobrevivencia, se reducen significativamente”.

Las integraciones fisiológicas son útiles para describir el índice de “salud” o condición fisiológica de los animales en el medio natural. Bayne *et al.* (1976) define el estrés como “una alteración medible del estado estable fisiológico (o bioquímico, o citológico, o del comportamiento), inducido por un cambio ambiental que hace al individuo (población o comunidad), más vulnerable a nuevos cambios ambientales”. La condición de estrés, según los autores debe explicar desventajas para el individuo antes de ser aceptada como tal. El problema es distinguir entre las respuestas de estrés y las adaptativas. Las respuestas primarias de estrés son nerviosas y endócrinas, las segundas son consecuencia fisiológicas de las primeras y ambas categorías de respuestas evolucionan como mecanismos adaptativos que capacitan al organismo para enfrentar las presiones externas, movilizandando reservas extras de energía (Pickering, 1981).

Las respuestas de estrés se visualizan como cambios en todos los niveles de organización biológica. Entre las reacciones primarias se citan la liberación de la hormona adrenergica de la hipófisis anterior, aumento en la producción y liberación de catecolaminas (epinefrina y norepinefrina) de la medula de la glándula adrenal y de corticoesteroides de la corteza de estas glándulas. Entre las secundarias son relevantes los cambios de la química sanguínea, en los tejidos, en ciertas funciones metabólicas y renales (diuresis). A nivel organismo, dichos cambios se reflejan en inmunodepresión, alteraciones osmoreguladoras, en el crecimiento y en el comportamiento migratorio en peces; estas respuestas se denominan terciarias. A niveles altos se reflejan en disminución en el reclutamiento y reducción en

el crecimiento de las poblaciones y alteraciones en la abundancia y diversidad de especies (Wedemeyer y McLeay, 1981). Por ello, como lo mencionan los autores, la comprensión de la fisiología sobre las respuestas de estrés y del grado de las alteraciones ambientales a las cuales los organismos puedan resistir o adaptarse, es básico en la determinación del impacto que producen los xenobióticos.

Con base en lo anterior, se ha desarrollado toda una línea de investigación ya que son indispensables los enfoques que permitan la identificación de las variables relacionadas con el estrés que sean relevantes desde todos los puntos de vista, biológicos y ecológicos y que sirvan para aumentar la capacidad predictiva (Addams, 1990).

De esta manera surgen los conceptos y estrategias sobre indicadores biológicos, que cumplan los requisitos, que proporcionen advertencias tempranas del daño provocado por los contaminantes y que permitan proteger los ecosistemas en el amplio sentido de la palabra. Se mencionan en la literatura las pruebas de desafío (Schreck, 1981; Wedemeyer y McLeay, 1981), los indicadores de exposición a estresores ambientales (Hinton y Lauren, 1990; Thomas, 1990) y los indicadores de desempeño de los organismos en el medio alterado (Schreck, 1990).

En el mismo sentido Koeman (1991), clasifica los marcadores biológicos en a) indicadores de exposición a los contaminantes ambientales; b) indicadores del efecto producido por estos; y c) indicadores de la susceptibilidad a los tóxicos.

En todos los diversos enfoques bajo los cuales se investiga el efecto de los estresores a diferentes niveles e la jerarquía biológica, se hace hincapié en la necesidad de disponer de patrones normales con fines de comparación. Nuevamente esto apunta al trabajo multidisciplinario (Heath, 1990).

TERMOREGULACIÓN Y ESTRÉS TÉRMICO

Las desviaciones que presentan las respuestas de los organismos acuáticos a la temperatura, también se utilizan como índices de estrés ya que la temperatura actúa como un

factor limitante y controlador de las respuestas fisiológicas y de comportamiento, a la vez que delimita la distribución de las especies. Por lo tanto, las alteraciones que presenten dichos

organismos a causa de condiciones adversas como la contaminación térmica o química serán desventajosas.

Con respecto al comportamiento de los organismos móviles, en el medio natural, se ha observado repetidamente que tienden a congregarse en determinados intervalos (Brett, 1956; Cairns *et al.*, 1975; Burton *et al.*, 1985). La selección de temperatura se asocia a la capacidad termorreguladora vía comportamiento, sujeto a control nervioso (Reynolds y Casterlin, 1979; Nelson y Hooper, 1982; Giattina y Garton, 1982; Espina *et al.*, 1993).

Cuando los animales se exponen a gradientes térmicos experimentales, se ha observado que peces y crustáceos se encuentran más frecuentemente o permanecen más tiempo en ciertos intervalos de temperatura. También se ha comprobado que si bien los organismos se desempeñan eficientemente en la zona de tolerancia a la temperatura, o hacen óptimamente en la parte denominada zona de preferencia térmica. Kellog y Gift (1983), mostraron en cuatro especies de peces que este intervalo de temperatura concordaba (96-100%), a lo menos, con el 75% del crecimiento máximo de los animales. Jobling (1981) señala que esto ocurre cuando los animales se alimentan en exceso. Así, es posible suponer que en dicho intervalo la temperatura no desencadena un tipo de actividad particular sino que el efecto es mucho más amplio; esto es, gobierna la eficacia del desempeño del animal (Brett, 1956).

El comportamiento termorregulador se ha considerado significativo desde el punto de vista ecológico, ya que es determinante en el movimiento y en la distribución de la especie (Giattina y Garton, 1982).

Jobling (1994) menciona que la preferencia térmica no está fijada genotípicamente y al igual que la tolerancia térmica, puede ser influida por los factores ambientales. Señala, como ejemplo, que los peces en condiciones hipóxicas (cerca de 50 mmHg) seleccionan temperaturas más bajas que las que prefieren en situaciones normóxicas. El autor explica las ventajas de tal comportamiento debido a que en las bajas temperaturas el metabolismo global del animal baja y por lo tanto las demandas de oxígeno disminuyen; por otra parte la afinidad de

la hemoglobina por el oxígeno disminuye en la temperaturas bajas, por lo que habría un suministro de oxígeno adecuado en los tejidos a pesar de las condiciones hipóxicas del medio.

En los juveniles de *Penaeus aztecus* de la laguna de Tamiahua, mantenidos en 30‰ y en condiciones normóxicas, se determinó la preferencia térmica (Vanegas, 1988; Vanegas *et al.*, 1990). La temperatura seleccionada por los camarones fue de 16.5-17.5°C; sin embargo; el máximo crecimiento se obtuvo en 25°C. Es probable que la preferencia por las temperaturas bajas sea reflejo de los mecanismos que inducen la migración a aguas profundas y frías, lo cual tendría un mayor valor adaptativo, para la especie, que un intervalo térmico que favoreciera el crecimiento óptimo.

Dentro de las zonas de resistencia se encuentran las temperaturas críticas máximas (CTMax) y mínimas (CTMin) que según algunos autores, marcan el límite entre las zonas de resistencia y las zonas letales (Hutchinson, 1957; Jobling, 1981).

Las CTMax y CTMin se definen como las temperaturas a las cuales la actividad locomotora se desorganiza y el animal pierde la capacidad para escapar de la condición que de persistir, le provocará la muerte (Cowles y Bogert, 1944). La determinación de las temperaturas críticas, constituye una herramienta útil para los estudios ecofisiológicos de adaptación y de estrés. Al respecto, Paladino *et al.* (1980) señalan que pueden ser un buen indicador de la capacidad de los organismos para aclimatarse a la temperatura y además de la acción de los estresores sinérgicos del ambiente.

Varios factores influyen las temperaturas críticas de los animales, como la edad y el estado fisiológico de los organismos; las estaciones del año, la salinidad del medio y la historia térmica previa de los especímenes. Tales factores alteran la tolerancia a la temperatura de los animales (Wiesepape *et al.*, 1972; Burton *et al.*, 1981; Buchanan *et al.*, 1988). Diferencias en los procedimientos experimentales se pueden traducir en valores más altos o más bajos de las temperaturas críticas (Becker y Genoway, 1979; Cox y Beauchamp, 1982). El efecto de la aclimatación térmica sobre las temperaturas críticas, así como de otras respuestas al estrés

térmico se ha comprobado en los juveniles del camarón *Penaeus aztecus* (Vanegas, 1988;

Vanegas, *et al.*, 1990) y en *Procambarus clarkii* (Díaz *et al.*, 1994).

RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y FACTORES DEL MEDIO

Las respuestas fisiológicas de los organismos ante los estímulos ambientales que se describen a continuación, se seleccionaron acorde a la importancia que tienen para los estudios ecotoxicológicos. Las respuestas fisiológicas de un organismo son reflejo de los procesos que se llevan a cabo a niveles celulares y subcelulares (Capuzzo, 1988) y permiten la adecuación al medio; los factores ambientales modulan dichas respuestas actuando como controladores, enmascaradores o directrices, si se les considera en un gradiente espacio-temporal y también pueden ser limitantes y hasta letales, si su intensidad sobrepasa la capacidad global de tolerancia del organismo (Fry, 1971) (Tabla 1). Repetidamente se ha mencionado que en la naturaleza, los factores del medio actúan en conjunto y el animal responde de manera integral.

Si se considera que los factores ambientales influyen en el metabolismo animal, su grado de influencia se manifestará a través de las actividades del organismo. Bartholomew (1972) señala que las reacciones conducentes a la liberación de la energía de los materiales asi-

milados por el animal y la subsecuente transformación de la energía en trabajo fisiológico regulado, son enormemente complejas. Todas estas reacciones e interacciones se engloban en la palabra metabolismo. Fry (1971) definió el metabolismo como "la suma de las reacciones que producen la energía que luego el organismo emplea en diversas actividades". Por actividad se entiende no solo el movimiento sino también todo proceso en el que se utilice la energía

En los estudios ecofisiológicos las respuestas de los organismos se miden aisladamente y se consideran por esta razón como respuestas simples, lo cual no significa que se ignore su complejidad. Posteriormente, estas respuestas se integran con el fin de profundizar en la comprensión de ciertos procesos dado que dichas integraciones simples proporcionan mayor información que la obtenida de las respuestas fisiológicas aisladas. También se llevan a cabo integraciones complejas, como el campo de crecimiento derivado del balance energético del organismo (Bayne *et al.*, 1976).

Tabla 1. Clasificación de los factores ambientales por su efecto sobre los organismos (Modificado de Fry, 1974).

Efectos a Nivel Específico	Factor	Clasificación
Limita la zona de tolerancia del organismo fuera del cual destruye su integridad fisiológica	Cualquier factor físico-químico	Letal
Gobierna la tasa metabólica por su influencia en la activación molecular de los componentes de la cadena respiratoria	Temperatura	Controlador
Limita la máxima tasa metabólica dada por el factor controlador al interferir en la bioquímica de la cadena respiratoria	Agua, alimento, gases disueltos	Limitante
Modifica el efecto de un primer factor, potencian la regulación fisiológica, a través de estrategias anatómicas de los organismos (superficies permeables; cámaras gaseosas)	Salinidad presión hidrostática	Enmascarador
Gobierna la respuesta del organismo en relación al gradiente del factor (en espacio y tiempo); a través de la estimulación de respuestas sensoriales, hormonales y cinéticas. Los dos últimos factores involucran la regulación orgánica (mecánica, fisiológica y conductual)	Temperatura, fotoperíodo, sustancias disueltas	Directriz

RESPUESTAS FISIOLÓGICAS SIMPLES

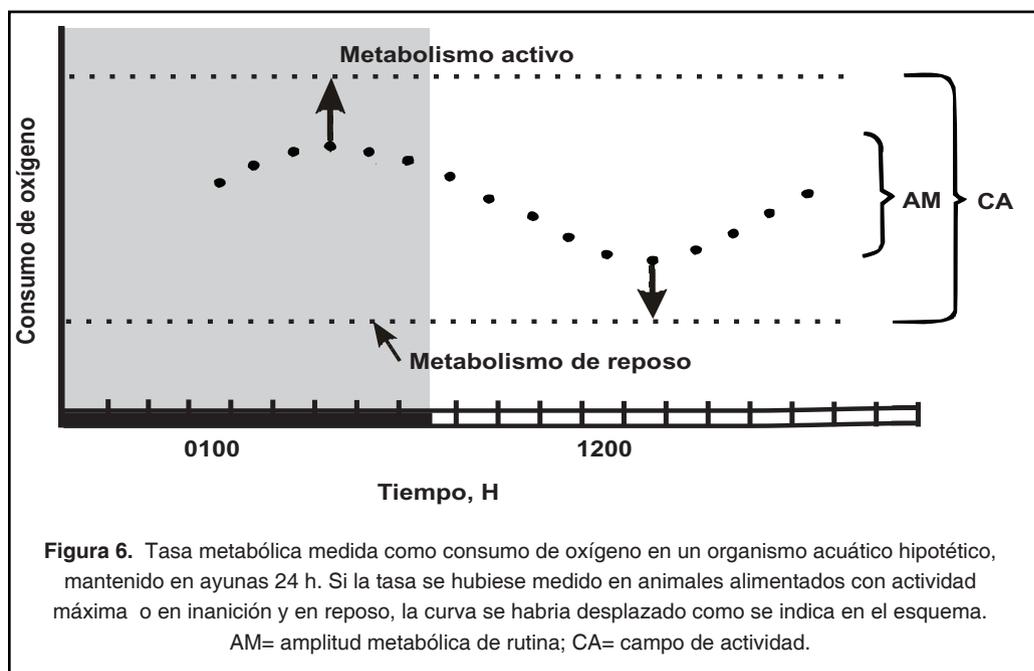
El metabolismo aerobio de un animal *in vivo* se mide generalmente de forma indirecta a través del consumo de oxígeno. El consumo de oxígeno se considera como una de las respuestas más englobadoras y directas de la interacción entre un animal y el medio circundante. Las diferentes categorías de los factores ambientales tienen su expresión a través del efecto que ejercen sobre el metabolismo mínimo y máximo de un organismo. Esto se refiere al metabolismo estándar o de reposo y al metabolismo activo. La tasa metabólica de reposo, proporciona una estimación de los requerimientos mínimos para el mantenimiento, en tanto que la tasa activa es indicadora de la actividad máxima sostenible. La tasa de rutina, se refiere a la tasa de consumo de oxígeno medida durante la mínima actividad locomotora no controlada (Fig. 6).

La diferencia entre el consumo de oxígeno activo y estándar, se denomina campo de actividad y se define como el potencia del organismo para llevar a cabo actividades tales como la natación, el crecimiento y la reproducción (Fry, 1974).

Entre los factores bióticos y abióticos que influyen más significativamente la tasa metabó-

lica estándar se puede mencionar los ritmos fisiológicos como la reproducción, las fases lunares (mareas), el ciclo diurno de luminosidad, la salinidad y la temperatura, el proceso de muda en los crustáceos y el peso corporal (Bishop *et al.*, 1980). El consumo de oxígeno de rutina es influido de manera similar aunque se citan ciertas excepciones.

Subrahmanyam (1976) encontró que la tasa metabólica y la actividad locomotora de los cangrejos *Uca*, *Callinectes* y *Carcinus* tienen ritmos en fase con la marea. Asimismo señala que los camarones peneidos exhiben una actividad rítmica relacionada con las fases lunares y con los ciclos diurnos de luz-obscuridad. Por ejemplo, *Penaeus duorarum* aumenta su actividad en la noche y dicho aumento es mayor durante la marea alta nocturna; sin embargo, la natación activa asociada a las mareas se extingue después de unos pocos días de permanencia en el laboratorio, en tanto que la actividad nocturna permanece. El aumento locomotor se refleja en el consumo de oxígeno de los camarones. Resultados similares se encontraron en *Penaeus aztecus* de la Laguna de Tamiahua, Veracruz (Díaz *et al.*, 1989).



Otro ejemplo lo constituye el cangrejo *Carcinus mediterraneus* en el que se observó una tasa metabólica de rutina bimodal, con un nivel más alto en la noche que en el día, reflejo de la actividad locomotora en busca de alimento. Durante el día los animales presentaron un segundo máximo de consumo de oxígeno. Esto sugiere un gasto extra de energía asociado a la inversión de la corriente branquial que contrarresta la sofocación producida por el exceso de sedimentos finos, transportados por las olas, los cuales se acumulan en las branquias. Por tanto, este aumento de consumo de oxígeno no se puede atribuir al ciclo de mareas del lugar (Díaz-Iglesia, 1976).

Entre las excepciones también se cita que el consumo de oxígeno de rutina *Penaeus esculentus* no es afectado mayormente por las mareas (Dall, 1986).

Con relación a la salinidad, tanto en los peneidos como en los palemonidos existen mecanismos altamente organizados y controlados que se traducen en una eficiente capacidad osmorreguladora. Kutty *et al.* (1971) supusieron que los cambios que ocurren en los factores del medio se deberían reflejar en el consumo de oxígeno de los especímenes de *Penaeus indicus* aclimatados en diferentes combinaciones de salinidad y de temperatura. Los datos obtenidos indicaron que la respuesta metabólica era fuertemente influida por la temperatura, mas no por la salinidad. En cambio, Scelso y Zúñiga (1987) no encontraron influencias significativas de estos factores sobre la tasa de consumo de oxígeno en *Penaeus brasiliensis*, aunque dicha tasa mostró una tendencia a aumentar en la mayor salinidad (50‰) al incrementarse la temperatura de 25-30°C. Los autores suponen que el efecto de la temperatura no fue significativa debido a que las temperaturas experimentales se encuentran en el espacio térmico natural de *P. japonicus*, se observó un incremento máximo de consumo de oxígeno al descender la salinidad de 37-10‰, aunque es necesario considerar que entre 10 y 55‰ la mortalidad fue de un 30% (Dalla Via, 1986).

En la laguna de Tamiahua, Veracruz, ejemplares de *P. aztecus* aclimatados a diferentes combinaciones de salinidad y temperatura (10, 15, 20, 25 y 30‰; 20, 25 y 30°C) se observó que solo la temperatura modificaba de mane-

ra significativa la tasa metabólica. El consumo de oxígeno se incrementó notoriamente al subir la temperatura de 20-30°C (Vanegas, 1992; Vanegas *et al.*, 1993).

En la parte alta del Golfo de México (Venkataramiah *et al.*, 1974) y el sistema lagunar de Mandinga, Veracruz (Espina *et al.*, 1976) ejemplares de *P. aztecus* presentaron respuestas similares, dependientes de la temperatura.

De manera contrastante, en los palemonidos *Palaemonetes varians* y *Palaemon northropi* (zoea I), la salinidad afecta la tasa de consumo de oxígeno de diferentes maneras, dependiendo del hábitat de las especies. Esto es, en los especímenes marinos disminuye cuando están expuestos a 26‰; en cambio en los sistemas lagunares estuarinos, aunque también se observa una disminución, esta ocurre solo a 6‰ (Moreira *et al.*, 1982). En *Metapenaeus monoceros* se ha descrito un patrón de respuesta semejante a la de *P. varians* (Rao, 1958).

Entre los moluscos, se encontró que *Tivela stultorum* la tasa respiratoria se elevó significativamente al incrementarse la temperatura de 13-21°C en diferentes salinidades experimentales (Espina, 1989; Espina y Bückle, 1994), en tanto que en *Mytilus edulis* el consumo de oxígeno disminuyó al subir la temperatura a 21°C (De Vooy, 1976). Tales discrepancias podrían reflejar las diferencias climáticas inherentes a la latitud.

Varios autores han estudiado los cambios metabólicos a través del consumo de oxígeno, ocurridos durante el desarrollo de los crustáceos. En la langosta *Nephrops norvegicus*, Alcaraz y Sarda (1981) obtuvieron los valores más altos, inmediatamente después de la muda; durante la fase de intermuda, el consumo de oxígeno disminuyó y se incrementó nuevamente en la premuda. Dichos cambios se atribuyen al crecimiento y a la renovación de tejidos por una parte y por otra, a la acumulación de calcio. Patrones de respuesta coincidentes se han encontrado en varios crustáceos pertenecientes a infraórdenes *Penaeoidea*, *Astacidea*, *Anomura* y *Brachyura* (Anger, 1991).

Entre los factores intrínsecos que modifican la tasa metabólica se considera, en primer lugar, el tamaño corporal. En general la tasa de con-

sumo de oxígeno (VO₂) es proporcional a una función potencial del peso del organismo (P): VO₂ = a P^b, donde *a* y *b* son los parámetros de la ecuación y *e_i* es el error estadístico del modelo. El modelo es intrínsecamente lineal y su transformación logarítmica permite calcular los parámetros señalados. Así, la ecuación de regresión queda definida a partir de la estimación de dichos parámetros: $\log Y_i = \log a + b \log X_i \pm \log e_i$, donde $\log Y_i$, $\log a$ y $\log b$ son los valores estimados de la tasa fisiológica, de la ordenada al origen y de la pendiente de la recta, respectivamente; X_i es el valor observado del peso y e_i es la estimación del error; $i = 1, 2, \dots, n$.

En la mayoría de los crustáceos, la tasa metabólica cambia en una relación intermedia, $b = 0.75$, entre la superficie y el peso, en cuyo caso las pendientes son $b = 0.66$ y $b = 1.0$, respectivamente (Alcaraz, 1974). En general el exponente varía entre 0.5 y 1.0; por ejemplo en *Palaemon serratus*, el consumo de oxígeno se relaciona con la superficie ($b = 0.581$), en *Palaemon elegans*, la pendiente $b = 0.731$, no fue significativamente diferente de $b = 0.66$ en 15, 18 y 20°C (Alcaraz, 1974). En *Penaeus indicus*, Kutty *et al.*, (1971) mencionan que el peso influyó significativamente en el consumo de oxígeno.

En general, se sugiere que las variaciones que experimenta el metabolismo del animal, ante los factores del medio, pueden estar asociadas con fenómenos dependientes de las membranas tales como la disponibilidad del sustrato para el sistema enzimático de las mitocondrias. También se menciona que en un cierto intervalo térmico, el metabolismo de *Littorina* sp. prácticamente no es afectado por la temperatura, pero que dicho intervalo cambia con la estación. Este fenómeno podría deberse a la inducción o inhibición de enzimas reguladoras claves (Newell, 1978).

En relación a la tasa de excreción de los organismos acuáticos se distingue entre excreción endógena y exógena. La primera se refiere a los productos de excreción derivados de la transaminación y la diseminación de los aminoácidos resultantes del recambio y degradación de las proteínas de los tejidos. Debido a que aproximadamente el 90% de estos aminoácidos se reutilizan en la síntesis de los teji-

dos, esta tasa es muy baja. La excreción exógena proviene de la desaminación directa de los aminoácidos incorporados y absorbidos del alimento; por lo tanto esta tasa es influida por la tasa de ingestión, el contenido proteico de la dieta y su composición en aminoácidos esenciales y no esenciales. La excreción endógena es influida por el tamaño y por la temperatura (Jobling, 1993).

La fracción amina de los aminoácidos no es metabolizada y es excretada mediante procesos químicos de transaminación y desaminación, en los que intervienen varias vías enzimáticas que conducen a la liberación de NH₃. El amoniaco se une a los protones de las soluciones acuosas y forma el ión amonio (NH₄⁺). La fracción del amonio total (NH₃ + NH₄⁺) presente como amoniaco se incrementa al subir el pH y la temperatura y disminuye al aumentar la fuerza iónica de las soluciones acuosas.

Los mecanismos de excreción en la branquia son varios; la difusión pasiva del amoniaco y el intercambio iónico del amonio son los más importantes. La contribución relativa de los diferentes mecanismos no se conoce con certeza, pero se estima que la difusión pasiva del amoniaco es del 60% o más del flujo de salida de los productos amoniacaes; aproximadamente el 20% de la excreción es vía de los mecanismos de intercambio iónico del amonio y la diferencia podría adjudicarse a la difusión del NH₄⁺ a través del epitelio branquial. Así, la difusión pasiva del NH₃ y del NH₄⁺ a favor de sus respectivos gradientes de presión parcial, pueden representar dos vías paralelas e independientes de la excreción nitrogenada en la branquia (Jobling, 1994).

Los peces en general, también excretan en menor cantidad urea y creatinina, vía orina, branquias o piel; en los peces marinos sin embargo, el 30 a 40% del nitrógeno excretado puede ser en la forma de urea y otros metabolitos. La excreción de urea es influida solo ligeramente por la tasa de ingestión (Jobling, 1994). Du Preez y Cockroft (1988) mencionaron que la tasa de excreción amoniaca del teleosteo marino *Lichia amia* aclimatado a 15, 20 y 25°C, es dependiente de la temperatura; los valores fueron significativamente mayores en 25°C que en las otras temperaturas.

Los invertebrados acuáticos excretan principalmente amonio y dicha tasa es dependiente de la temperatura. En *Penaeus aztecus* de la laguna de Tamiahua, Veracruz, se midió la excreción amoniacal en 15 combinaciones de temperaturas (20, 25 y 30°C) y salinidad (10, 15, 20, 25 y 30‰). Los resultados ($\text{mg h}^{-1} \text{g}^{-1}$ peso seco libre de cenizas) se relacionaron con las variables ambientales a través de un polinomio de segundo grado. La ecuación mostró que ambas variables actúan en forma independiente; la tasa de excreción aumenta considerablemente al disminuir la temperatura desde 26-27°C hasta los 20°C, y en cambio aumenta hacia los 30°C. Con respecto a la salinidad, los mayores valores se encontraron entre 18 y 22‰ en todas las temperaturas experimentales (Vanegas *et al.*, 1996).

En los moluscos la excreción amoniacal esta igualmente influida por diversos factores, entre los que se mencionan el tamaño, la condición fisiológica, el ciclo reproductivo, la temperatura, la salinidad, la estación del año y la latitud (Bayne y Widdows, 1978).

En la almeja Pismo (*Tivela stultorum*) de Baja California, la influencia de la temperatura y de la salinidad fueron notorias. En las almejas expuestas a 13, 16 y 21°C en combinación con 80, 100 y 110‰ de agua de mar (AM; 100%=32%) se observó que la tasa de excreción aumentó al incrementarse la temperatura en 100% AM y no cambió con respecto a la temperatura en 110 % AM. En contraste tuvo un aumento significativo en 80% AM y 16°C con respecto a 13 y 21°C (Espina y Bückle, 1994).

INTEGRACIONES SIMPLES

En investigaciones sobre fisiología metabólica, las integraciones simples mas utilizadas, son el coeficiente respiratorio (CR) y la razón atómica O/N, las cuales son consideradas como "variables de estado" por Widdows y Johnson (1988). Variable de estado se refiere a que los cambios de las variables (oxígeno consumido, anhídrido carbónico producido y nitrógeno excretado) no dependen de estados intermedios sino solamente de valores iniciales y finales; son independientes de cómo el proceso tuvo lugar (Peusner, 1974). El coeficiente respiratorio es la razón entre el oxígeno consumido y el CO₂ producido en el mismo lapso, e indica el substrato utilizado en el catabolismo. El valor del CR es igual a la unidad cuando los carbohidratos son degradados; los valores de 0.9 y 0.7 se obtienen cuando los que se degradan son los lípidos, y las proteínas respectivamente.

Barber y Blake (1985) encontraron que en el bivalvo marino *Argopecten irradians concentricus*, el CR varía estacionalmente; asimismo observaron que en las fases tempranas de la gametogénesis los valores son altos y que disminuían a partir que los gametos maduraban y empezaba el desove. Debido a que en otras especies como *Mytilus edulis*, *Crassostrea gigas* y *Patinopecten yessoensis* se han obtenido valores coincidentes, los autores concluyeron que el CR podría ser un buen indicador

de las diferentes etapas del proceso de reproducción.

En contraste, Hatcher (1989) quien trabajó con cuatro especies de invertebrados bentónicos (el briozoo *Triphyllozoon* sp., la ascidia *Herdmania monus*, el quitón *Poneroplax albida* y el alubon *Halotis roci*), expresa que debido a las grandes diferencias encontradas entre los individuos de una misma especie no fue posible llegar a alguna conclusión.

Cuando se integran los valores del consumo de oxígeno y del nitrógeno excretado, en razones atómicas (O/N), se obtiene información a cerca del balance entre el catabolismo de las proteínas, lípidos y carbohidratos. Esta información es útil para conocer los ciclos de almacenamiento de energía de los organismos.

El mínimo teórico de la razón O/N entre 7.0 y 9.3 es indicativo del catabolismo proteico; valores mayores, sugieren que los carbohidratos y los lípidos han sido utilizados (Barber y Blake, 1985). Estos autores indican que, con bases estacionales, el estrés reproductivo y nutricional produce valores bajos de la razón como resultado de la utilización de las proteínas.

Lo anterior se comprobó también en *Donax vittatus* y *Mytilus edulis* (Bayne *et al.*, 1976;

Barber y Blake, 1985). Asimismo Gabbot y Bayne (1973) observaron modificaciones en la razón O/N de *M. edulis* resultantes de la inanición y de la exposición a las altas temperaturas. La escasez de alimento, en verano y en primavera, provoca la disminución de los valores de la razón debido a que las proteínas contribuyen con un 70 a 80% del total de la energía utilizada por los animales, durante la inanición. En el verano y otoño cuando se utilizan entre el 70 y el 100% del total de los carbohidratos y los lípidos, la razón O/N aumenta marcadamente.

Con respecto al efecto de la temperatura sobre los valores de la razón O/N *Mytilus edulis* mostró un aumento rápido de los primeros momentos de la aclimatación térmica, seguido por una estabilización en un tiempo posterior a niveles más bajos que el de los organismos del grupo control (Widdows y Bayne, 1971), lo cual se interpreta como un aumento en la utilización de los lípidos y de los carbohidratos durante la primera fase de la aclimatación.

En los juveniles de camarón *Penaeus aztecus* se evaluó el efecto de la temperatura y de la

salinidad sobre la razón atómica O/N. Los valores obtenidos señalaron un cambio en la utilización de nutrientes, dependiente de la temperatura; de un catabolismo de proteínas en 20°C (O/N=3.8-7.4), un metabolismo de lípidos y proteínas como sustrato energéticos en 30°C (O/N=25-45.7) (Venegas *et al.*, 1996) los autores señalan que la combinación de 25°C y 15 a 25‰ fue óptimo para el crecimiento de los organismos.

La cantidad de alimento es un factor determinante en el valor de la razón O/N. En *Mytilus edulis* las razones muy bajas dieron como resultado un valor de 20, pero cuando se suministraron raciones altas el valor O/N aumento a 50. La disminución del valor de la razón se puede deber a una pequeña reducción en el consumo de oxígeno o a un aumento en la tasa de excreción amoniacal. Una alta tasa de la degradación de las proteínas relativa al catabolismo de lípidos y carbohidratos se refleja en bajos valores de O/N, lo cual es un síntoma de estrés (Widdows, 1978).

INTEGRACIONES COMPLEJAS

Entre las integraciones fisiológicas complejas se encuentra el crecimiento de los organismos, el cual de acuerdo con Beamish y Trippel (1990), es una actividad controlada a nivel celular.

El crecimiento refleja los múltiples procesos que se llevan a cabo en el medio interno y es un indicador global de la adecuación del organismo al ambiente. Si esta es favorable al organismo crece pero cuando esta sujeto a variables estresantes del medio, el crecimiento se detiene. A menudo el crecimiento se describe a través de la tasa de crecimiento, es decir, al cambio en peso o en longitud del animal en un lapso determinado. Frecuentemente dicha tasa de cambio se expresa como crecimiento absoluto o crecimiento relativo cuyo caso especial es el crecimiento instantáneo y tasa de crecimiento y tasa de crecimiento absoluto que se calcula como: $G = \{(Ln P_f - Ln P_i) / (t_f - t_i)\} 100$, donde G es la ganancia en peso P(g/día; mg/

día) después de un cierto periodo de tiempo t; los subíndices i y f se refieren al momento inicial y final (Jobling, 1994).

La ganancia en peso es ampliamente utilizada para determinar la tasa de crecimiento de un organismo (Woo y Chiu, 1994). Sin embargo en este tipo de medición, no se toma en cuenta que puede haber cambios significativos durante el lapso del experimento; por ejemplo, en los organismos que crecen más rápido se deposita una mayor cantidad de lípidos en sus tejidos que en los especímenes que crecen más lentamente (Jobling, 1993).

Varios factores influyen la tasa de crecimiento; obviamente destacan el estado de desarrollo, la actividad y la disponibilidad del alimento; el foto período, la salinidad y la temperatura, también influyen dicha tasa. Cabe destacar que la relación entre el crecimiento y la tasa de ingestión no es simplemente lineal; en los estu-

dios sobre el efecto de los factores ambientales en el crecimiento, es fundamental considerar este fenómeno (Jobling, 1994).

Entre los moluscos, en *Mercenaria mercenaria* el crecimiento de la concha disminuye durante los meses fríos del año, lo cual se atribuye a la escasez de alimento más que a la influencia de la temperatura *per se*. De la energía contenida en los recursos disponibles, el bivalvo canaliza una importante porción hacia las reservas, las que en la época apropiada del año se utilizan en la gametogénesis (Peterson y Fegley, 1986).

Otra medida integradora de los procesos fisiológicos que se llevan a cabo en el animal es la determinación del balance energético. De manera simplificada, tal balance se representa en la siguiente ecuación acorde a Calow (1985): $C = P + R + E$ donde C se refiere a la ingestión (I) del alimento utilizado en la síntesis de tejido o producción P, y como combustible en los procesos metabólicos y trabajo químicos designados por R; parte de los recursos se pierden en los productos de excreción E. El metabolismo total R se subdivide en metabolismo de reposo o de mantenimiento o de estándar (Rs); de rutina (Rr); de alimentación (Rf) denominado acción dinámica específica, efecto calorígeno o efecto térmico, incremento calórico o termogénesis inducida por la dieta; todos estos términos "presumiblemente" describen series similares de procesos bioquímicos y fisiológicos que ocurren en diferentes grupos de animales (Jobling, 1993).

Calow (1985) también agrega el metabolismo activo (Ra) e indica que las demandas de energía, además de las requeridas por el animal cuya actividad "rutinaria" (Rr) son aditivas: $R = R_s + R_r + R_f + R_a$. A su vez P es dividida en dos componentes somático (Pg) y reproductivo (Pr) y por último E incluye las pérdidas de heces (H), en productos de excreción nitrogenada, principalmente amonio/amoniaco y urea, en peces (U) y secreciones en general, principalmente mucus (Muc) a las que habría que agregar la exuvia en crustáceos. Así la ecuación en general propuesta por Calow (1985 es de la forma:

$$C = (R_s + R_r + R_f + R_a) + (P_g + P_r) + (H + U + Muc).$$

Todos estos componentes se expresan como

tasas en unidades de energía/tiempo (J/día; 1 cal = 4.2 J).

Las implicaciones que tienen la medición de las diferentes tasas y su integración en el balance energético son esenciales para la fisiología, la ecofisiología y la ecotoxicología. La energética fisiológica proporciona un marco a la relación "causa-efecto" común a todos los organismos y por lo tanto da cuenta del efecto biológico producido por los factores ambientales. Proporciona información sobre los procesos claves de la adquisición de la energía y del gasto, por lo tanto la energía disponible para crecimiento somático (Pg) y producción de gametos (Pr) englobados en lo que se llama campo de crecimiento (CDC). También refleja algunos de los mecanismos de toxicidad, a través de la comprensión más profunda de las perturbaciones del balance energético (Widdows y Donkin, 1991).

La cantidad de energía que ingresa al sistema organismo, depende de la disponibilidad de recursos existentes en el medio y por lo tanto es limitada; también son los procesos de alimentación y la estructura que sustentan dichos procesos (De Kruijf, 1991). Si la energía es finita, la forma en que se distribuya en los diferentes componentes del balance energético tendrá un profundo efecto sobre los componentes metabólicos y los de ajuste o adecuación al medio. Entre los primeros se incluyen los efectos sobre la actividad, reparación, crecimiento y reproducción y entre los componentes de adecuación se tiene la sobrevivencia (s), el tiempo que tarda el desarrollo de las estructuras somáticas para permitir la reproducción (t) y la fecundidad (n); así el empleo de energía en actividad facilitara el escape del organismo de los depredadores e influirá positivamente s, la canalización de energía hacia Pg influirá sobre t y la inversión en Pr aumentaran en n, que se traducirá en el aumento del número de individuos (Calow, 1985). De este modelo de transacción de energía o "trueque" surge la idea que los procesos fisiológicos integrados en el balance energético están íntimamente relacionados con la dinámica de las poblaciones (De Kruijf, 1991).

En este mismo sentido Jobling (1994) señala que los estudios sobre bioenergética tienen aplicación en la estimación del crecimiento y

producción a nivel población. También son útiles en acuicultura, ya que proporcionan información útil para evaluar la importancia relativa de varios factores ambientales que influyen el crecimiento de los animales. El autor hace notar que aun existen problemas para evaluar la tasa de ingestión en las poblaciones naturales. Sin embargo, los métodos radiográficos han contribuido en la actualidad a su solución por lo menos, en las prácticas de cultivo.

Existe en la literatura varios ejemplos de la determinación de CDC en diferentes organismos. Se pueden citar las respuestas adaptativas de *Mytilus edulis* a los cambios de temperatura y de ración; el nivel de aclimatación térmica y las eficiencias de crecimiento, en un contexto ecológico Bayne y Newell, 1983; Widdows et al, 1984).

En la almeja pismo *Tivela stultorum*, se midió el CDC en varias combinaciones de salinidad-temperatura a niveles imperantes en el medio: a través de esta integración fue posible conocer las mejores condiciones en las que se deben mantener los adultos con el fin de apoyar el redoblamiento de los bancos naturales y la siembra, ya que por su lento crecimiento la especie no es apta para el cultivo (Espina y Bückle, 1994).

En el camarón café *Penaeus aztecus* de la laguna de Tamiahua, Veracruz, se midió la influencia de la salinidad sobre el crecimiento de los juveniles aclimatados a 10, 15 20, 25 y 39‰ en 20, 25 y 30°C. Asimismo se determinó el balance energético, lo que permitió conocer la energía asimilada y la máxima eficiencia neta de crecimiento, que en la combinación de 25‰ y 30°C fue de 39.6% (León et al., 1991; Vanegas, 1992; posteriormente se estimó el CDC que se presenta en la figura 7.

Bayne et al. (1976) consideran que el CDC es en si mismo una medida de estrés si el valor es reducida o negativa. Esto indica que el organismo ya no es capaz de crecer ni de reproducirse, lo cual implica desventajas para la población, del mismo modo, las eficiencias de crecimiento, derivadas del CDC son indicadores del estrés. Así K_1 es la eficiencia con la que el organismo utiliza la energía contenida en el alimento ingerido; K_2 es la eficiencia con la cual la energía contenida en el alimento asi-

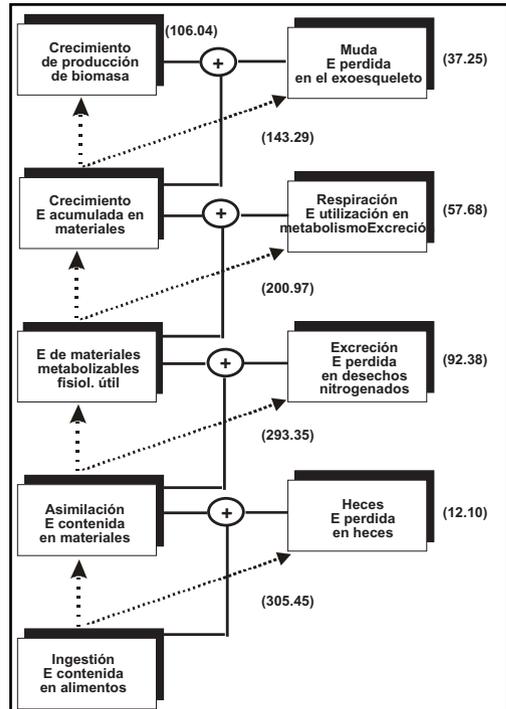
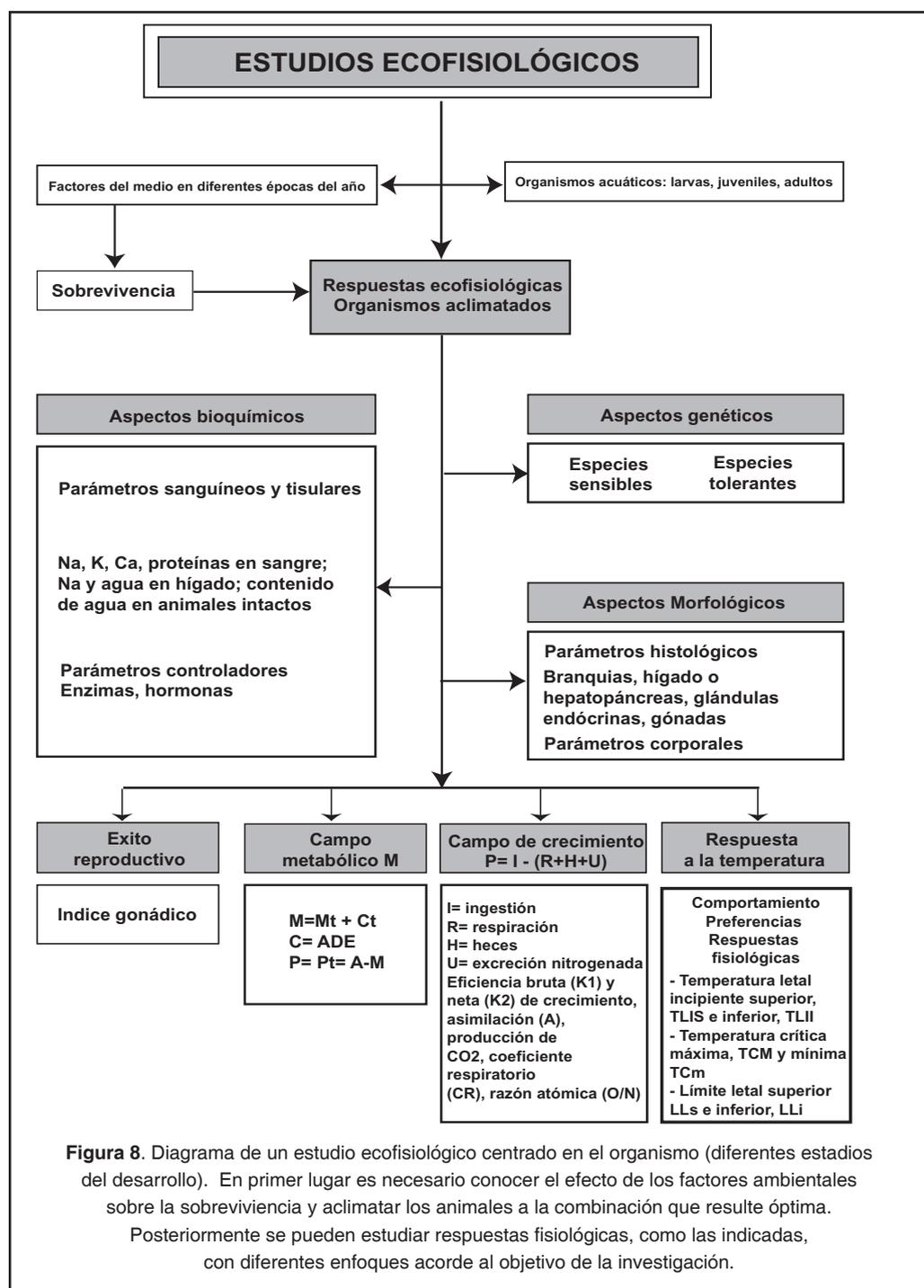


Figura 7. Representación del balance energético de un crustáceo cuando no se conoce la tasa de ingestión (línea continua) cuando ésta es conocida (línea quebrada). En paréntesis los valores en $\text{cal día}^{-1} \text{g}^{-1}$ PSLC para *Penaeus aztecus* juvenil (León et al., 1991; modificado por S. Espina).

milado es utilizada (Widdows, 1978; Griffith y King, 1979).

Los diferentes aspectos de un estudio ecofisiológico que son relevantes para las investigaciones ecotoxicológicas se presentan en la figura 8, se destaca la relación funcional entre el organismo y el medio sobre el cual se ha enfocado este trabajo, debido a la importancia que dicha relación tiene en el medio alterado. Es básico en ecofisiología poder interpretar las respuestas de organismo. En condiciones ambientales determinadas; en algunas situaciones existe información suficiente para lograr el objetivo pero en otras, dicha información es insuficiente y en este caso es necesario recurrir a los datos que proporcionan los estudios realizados a nivel suborganismo tales como bioquímicos, a nivel celular, de órganos y de sistemas de órganos. Los mecanismos tanto nerviosos como endocrinos capacitan al animal para sobrevi-



vir bajo condiciones adversas ya que son parte importante de su respuesta total incluyendo las respuestas compensadoras, reguladoras del balance ácido-básico de la sangre, movilización de reservas y otros (Hughes, 1981). También es necesario tener en cuenta los gradientes espacio-temporales; en cuanto al tiempo

po hay respuestas inmediatas y mediatas, en tanto que el espacio varía acorde al tamaño del organismo y su entorno desde mm² a km² en el medio natural y ciertos cambios en los factores aun pueden tener dimensiones globales, como por ejemplo, el CO₂ (Schreck, 1990)

Es esencial conocer si el organismo objeto de la investigación es una especie sensible o si se adapta con facilidad a las variaciones ambientales. Los estudios genéticos han sido de invaluable ayuda en este sentido (Addams, 1990). Si la selección se hace considerando el criterio de "punto final" (De Kruijf, 1991) la investigación se centrará en especies de importancia económica. En todos los casos se deberá conocer la biología de los especímenes tan profundamente como sea posible. Una vez conocida la especie y el estadio de desarrollo, hay que tomar en cuenta que la relación entre las especies fisiológicas y la masa corporal, no es simple por lo que es útil planear experimentos multifactoriales.

El último grado de estrés es la mortalidad; no obstante, existen diversos métodos para evaluar toda una gama de respuestas de estrés no tan categóricas y que permiten mediciones de tal condición a diferentes niveles de la jerarquía biológica (Addams, 1990). Entre las variables bioquímicas y moleculares, frecuentemente se miden los cambios en la actividad de enzimas asociadas con el metabolismo energético o con la osmoregulación de los animales, los niveles de ácido ascórbico, glutatión y proteínas (metalotioneínas) en los tejidos y la concentración de los principales iones y glucosa en sangre (Heath, 1994). Como las branquias y la piel están en íntimo contacto con el medio, las alteraciones histopatológicas en estos y otros órganos (hígado) son útiles en la interpretación en las respuestas del organismo. En la actualidad, es posible distinguir entre variaciones histológicas producidas por cambios fisiológicos naturales e histopatológicos inducidos por enfermedades o por lesiones provocadas por acción de los tóxicos ambientales antropogénicos (Hinton y Lauren, 1990).

Entre las respuestas fisiológicas, aquellas asociadas con el metabolismo energético se utilizan a menudo como indicadoras de estrés ya que se supone que el costo homeostático es mejor en animales estresados (Schreck, 1990). En el mismo sentido, la reducción del polígono de tolerancia observado al comparar ambas situaciones da cuenta de la severidad del estrés producido por factores ambientales como la temperatura (Jobling, 1994).

La interpretación y la extrapolación de los eventos ocurridos a través de los diferentes niveles de organización biológica (Fig. 3) implica trasladar los problemas en el tiempo y en el espacio, pero además significa traducir los procesos que se llevan a cabo en organizaciones "simples" a escalas multidimensionales y extremadamente compleja; dependiendo del poder de resolución "un observador puede cambiar arbitrariamente una perturbación en no-perturbación: desde la distancia nada parece haber cambiado" (De Kruijf, 1991). Esto refleja la gran preocupación que existe en identificar los enlaces entre un nivel jerárquico y el siguiente. Addams (1990) ilustra las conexiones entre diversos grupos de indicadores biológicos en la escala del tiempo y en cuanto a la relevancia ecológica. Si solo se miden las variables ecológicas, señala, no se podrán identificar las causas del deterioro y solo si se conocen los enlaces causales entre las respuestas indicadoras a nivel bioquímico, fisiológico, estructural e inmunológico, que suceden a corto plazo, tales indicadores podrán trascender a escala temporal.

El esquema de Addams (1990) sobresale la ubicuidad de la capacidad reproductiva y la energética fisiológica con relevancia tanto a bajos como altos niveles de organización. Los factores ambientales pueden producir cambios moleculares y bioquímicos, lo que a su vez interfiere con los mecanismos y sistemas de control del sistema reproductor; en consecuencia se reducirá la competencia reproductiva del organismo y esto se reflejará en el crecimiento intrínseco de la población a largo plazo. Las alteraciones en la regulación endocrina del sistema se consideran indicadores de advertencia temprana de deterioro ambiental (Thomas, 1990).

Por otra parte, cuando se contempla la energía como la "moneda común" en todas las funciones fisiológicas y en todas las transacciones dentro y entre los seres vivos y sus entornos (Widdows y Donkin, 1991) es fácil aceptar la trascendencia de la integración de las respuestas fisiológicas en el campo de crecimiento. Los autores informan que a través de estudios en el medio natural y en mesocosmos se ha confirmado las consecuencias a largo plazo de efec-

tos medidos sobre el balance energético a nivel individual; esto se refiere a la sobrevivencia y al crecimiento de individuos y poblaciones.

El estrés provocado por las variaciones y alteraciones de los factores ambientales se manifestarán primero en los peldaños iniciales de la jerarquía biológica antes que las perturbaciones se perciban a niveles más altos. De aquí se desprende el hecho insoslayable que estudios aislados de seguimiento sobre la química ambiental o referentes a las variables ecológicas, incluyendo el monitoreo biológico, no resuelven el problema. Esta es tarea de un conjunto de científicos especialistas y de autoridades con poder de decisión aun mas, se debe reconocer la participación de técnicos especializados en equipos sofisticados que aportan mayor

precisión y profundidad a las evaluaciones. No obstante, es preciso reconocer que tales mediciones no reemplazan las técnicas usuales, tal vez de baja sofisticación, sino que le sirven de complemento (Heath, 1990)

Por lo tanto, la experiencia acumulada indica que para comprender, a través de estudios ecofisiológicos, la relación del organismo con la contaminación es necesario conocer sus respuestas fisiológicas en diferentes etapas de desarrollo y tener en cuenta todos los factores del medio que de alguna manera las modifican. Además, explicarlas e interpretarlas considerando tanto los aspectos bioquímicos y genéticos como los fisiológicos, antes de intentar medir el efecto que tienen los contaminantes sobre la especie en estudio.

LITERATURA CITADA

- Addams, S.M., 1990.** Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. A fisheries Society simposium 8:1-8. In: S. M. Addams (Ed.) Biological Indicators of Stress in Fish. Bethesda, Maryland.
- Alcaraz, M., 1974.** Consumo de oxígeno en función del tamaño y temperatura en crustáceos. *Investigaciones Pesqueras*, 38: 289-404.
- Alcaraz, M y F. Sarda, 1981.** Oxygen consumption by *Nephrops norvegicus* (L), (crustacea: Decapada) in relationship with its moulting stage. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 54: 113-118.
- Anger, K., 1991.** Developmental changes in the bioenergetics of decapod larvae. *Mem of the Queensland Museum*, 31: 289-308.
- Aziz, K.A. y J.G. Greenwood, 1981.** A laboratory investigation of temperature and salinity tolerances of juvenile *Metapenaeus bennetiae* Racek and Dall (Crustacea: penaeidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 54:137-147.
- Barber, B.J. y N.J. Blake, 1995.** Substrate catabolism related to the production in the bay scallop *Argopecten irradians concentricus* as determined by O/N and RQ physiological indexes. *Marine Biology*, 87:13-18.
- Bartholomew, G.A., 1972.** Energy metabolism. p. 44-70. In: M.S. Gordon (Ed). Animal Physiology: Principles and Adaptations. The Macmillan Company, New York.
- Bayne, B.L. Widdows J y T.J. Thompson, 1976.** Physiological integrations, p. 261-291. In: B. L. Bayne (Ed.) Marine Mussels: Their Ecology and Physiology. Cambridge University press, Cambridge.
- Bayne, B.L. y J. Widdows, 1978.** The physiological ecology of two populations of *Mytilus edulis* L. *Oecologia* (Berlin) 37:137-162.
- Bayne B.L y R.C. Newell, 1983.** Physiological energetics of marine mollusc, p. 407-515. In: K.M. Wilbur, A.S. Salenddin (Eds). The Mollusca. Vol. 4. Physiology. Part I Academic Press. London.
- Beamish F.W.H y E.A. Trippel, 1990.** Heat increment. A static or dynamic dimension in bioenergetic models?. *Transactions of the American Fisheries Society*, 119: 649-661.
- Becker, C.D. y R.g. Genoway, 1979.** Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish. *Environmental Biology of Fishes*, 4:245-256.
- Bishop J.M. , J.G. Gosselink y J.H. Stone, 1980.** Oxygen consumption and haemolymph osmolality of brown shrimp. *Penaeus aztecus*. *Fisheries Bulletin*, 78: 741-757.
- Bowler K., 1963.** A study of the factors involved in acclimatization to temperature and death at high temperatures in *Astacus pallipes*. I. Experiments on intact animals. *Journal of Cellular Comparative Physiology*, 62:119-132.
- Brett, J.R., 1956.** Some principles in the thermal requirements of fishes. *The Quarterly Review of Biology*, 31: 75-87.

- Brett, J.R., 1958.** Implications and assessments of environmental stress, p. 69-83. *In:* P.A. Larkin (Ed). Investigations of Fish-power Problems. H.R. Mc. Millan lectures in fisheries. University of British Columbia.
- Buchanan, J.A., B.A. Steward y B.R. Davies, 1988.** Thermal acclimation and tolerance to lethal high temperature in the mountain stream amphipod *Paramelita nigroculus* (Barnard). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 89A; 425-431.
- Buikema, Jr., A.L. B.R. Nielderlemer y J. Cairns Jr, 1982.** Biological monitoring. IV-Toxicity testing. *Water Research*, 16: 239-262.
- Burton, D.T., T.P. Capizzi, S.L. Margrey y W.W. Wakefield, 1981.** Effects of rapid changes in temperature on two estuarine crustaceans. *Marine Environmental Research*, 4: 267-278.
- Cairns Jr. J., 1982.** Introduction, p. 7-11. *In:* J. Cairns Jr. (Ed). Biological Monitoring in Water Pollution. Pergamon Press, New York.
- Cairns Jr. J. y W.H. Vander Schalie, 1982.** Biological monitoring. I-Early warning systems. *Water Research*, 14: 1179-1196.
- Cairns Jr. J, A.G. Heath, y B.c. Parker, 1975.** The effect of temperature upon toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hidrobiologia*, 47:135-171.
- Calow, P., 1985.** Adaptive aspects of energy allocation, p. 13-31. *In:* P. Tyler and P. Calow (Eds). Fish Energetics. New Perspectives. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland.
- Calow P., y R.M. Sibly, 1990.** A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. *Functional Ecology*, 4: 283-288.
- Capuzzo, J.M., 1988.** Physiological effects of a pollutant gradient summary. *Marine Ecology Progress Series*, 46: 147-148.
- Cowles, R.B., y C.M. Bogert, 1944.** A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Bulletin of American Museum of Natural History*, 83:265-296
- Cox, D.K., y J.J. Beauchamp, 1982.** Thermal resistance of juvenile crayfish. *Cambarus bartoni* (Fabricius): Experiments and model. *American Midland Nature*, 108: 187-193.
- Dall, W., 1996.** Estimation of routine metabolic rate in a penaeid prawn *Penaeus esculentus* Haswell. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 96: 57-74.
- Dalla Via, G.J., 1986.** Salinity responses of the juvenile penaeid shrimp *Penaeus japonicus*. I-Oxygen consumption and estimation of productivity. *Aquaculture*, 55: 297-306.
- D Kruijf, H.A. M., 1991.** Extrapolation through hierarchical levels. *Comparative biochemistry and physiology*. 100C: 291-299.
- De Vooy C. G.N., 1976.** The influence of temperature and time of year on the oxygen uptake of the sea mussels *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 36: 25-39.
- Díaz, F., S. Espina, C. Rosas, A. Sánchez, C. Vanegas, y E. Díaz-Iglesia, 1989.** Ritmo respiratorio y amplitud metabólica del camarón café *Penaeus aztecus* (Tamiagua, México) con ablación de los pedúnculos oculares. *Revista de Investigaciones Marinas*, 10: 27-39.
- Díaz, F., S. Espina, y L. F. Bückle Ramírez, 1994.** Thermal stress responses of *Procambarus clarkii*. *Rivista italiana Acquacultura*, 29: 149-154.
- Díaz-Iglesia, E., 1976.** Consumo de oxígeno y ritmo respiratorio del cangrejo *Carcinus mediterraneus* del litoral romano del mar negro. *Investigaciones Marinas*, 8:11-21.
- Du Preez, H. H., y A.C. Cockcroft, 1988.** None faecal and faecal losses of the marine teleost *Lichia amia* (Linnaeus, 1858), feeding on live southern mullet *Liza richardsonii* Smith. 1846). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90A: 71-77.
- Eddy. F.B., 1981.** Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish, p. 77-102. *In:* A.D. Pickering (Ed). Stress and Fish. Academic Press inc. Ltd. London.
- Espina, S. A. Muñoz, R. Villalobos, F. Díaz, J. Latournerié, A. Sánchez, 1976.** Metabolismo respiratorio y osmoconcentración en dos especies de penaeidos de la laguna de Mandinga Ver., México, p. 27-50. *In:* Mem. del Simposium sobre Biología y Dinámica Poblacional de Camarones, Guaymas, Sonora. Agosto 8-13, 1976.
- Espina, S., 1989.** Balance energético de *Tivela stultorum* (Mollusca, Lamellibranchia): influencia de factores intrínsecos y extrínsecos. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 123 p.
- Espina, S. F. Díaz, y L. F. Bückle Ramírez, 1993.** Preferred and avoided temperatures in the crawfish *Procambarus clarkii* (Decapoda, Cambaridae). *Journal of Thermal Biology*, 18:35-39.
- Espina, S., y F. Bückle Ramírez, 1994.** Scope for growth as function of temperatura salinity and body weigh in *Tivela stultorum* (Mollusca Lamellibranchia). *Journal of Applied Aquaculture*, 4: 91-100.

- Ferrero, E. A. 1985.** Ecofisiología, Nuova disciplina o nuova eticheta? *Oebelia*, 11: 1-22.
- Freedman, B., 1989.** Environmental Ecology. The Impact of Pollution and Other Stresses on Ecosystem Structure and Function. Academic Press, New York.
- Fry, F. E. J., 1971.** The effect on environmental factors on the physiology of fish p. 1-98. *In:* W.S. Hoar and D.J. Randall (Eds). Fish Physiology. Vol 6. Academic Press, New York
- Fry, F.E.J., 1974.** Effects of the environmental on animal activity. University of Toronto Studies Biological Series 55. Ontario Fisheries Research. *Laboratory publication*, 68: 1-62.
- Gabbot, P.A., y B.L. Bayne, 1973.** The effect of concentration of suspension on the filtration rates and pseudofaecal production for *Mytilus edulis*, *L. Cerastoderma edule* L. and *Venerupis pallustrata* (Montagu). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 17:1-22.
- GESAMP (IMO / FAO / UNESCO / WMO / WHO / IAEA / UN / UNEP Joint Group of Expert on the Scientific Aspect of Marine Pollution), 1980.** Monitoring biological variables related to marine pollution UNEP. *Regional Seas Report and Studies*, 11: 1-22
- Giattina, J.D., y R.R. Garton, 1982.** Graphical model of thermoregulatory behavior by fishes with a new measure of eurythermality. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39: 554-528.
- Griffith, C.L., y J.A., King, 1979.** Some relationship between size, food availability and energy balance in the ribber mussel *Aulacomya ater*. *Marine Biology*, 51: 141-149.
- Gutiérrez-Galindo, E.A., 1989.** Bioensayos y pruebas de evaluación toxicológicas, p. 1-58. *In:* Curso regional de entrenamiento INDERENA / PAC / PNUMA / FAO/ COI – Ensayos biológicos y pruebas de toxicidad para formular un criterio de calidad de agua en el Gran Caribe y Golfo de México, Cartagena de Indias, Colombia.
- Hatcher, A., 1989.** RQ of bentic marine invertebrates. *Marine Biology*, 102: 445-452.
- Heat, 1A.G., 1990.** Summary and perspectives american fisheries society symposium, p. 183-191. *In:* S. M. Addams (Ed) Biological Indicators of Stress in Fish. Bethesda, Maryland.
- Hinton, D. E., y D.J. Lauren, 1990.** Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. , p. 51-66. *In:* S. M. Addams (Ed). Biological Indicators of Stress in Fish. American Fisheries Society Symposium. Bethesda, Maryland.
- Hochachka, P.W., y G.N. Somero, 1973.** Biochemical adaptation: basic mechanisms and strategies., p. 1-14. *In:* P.W. Hochachka, y G.N. Somero (Eds). Strategies of Biochemical Adaptation. Saunders Co. Philadelphia.
- Howell, G., 1976.** Introduction, p. 1-5. *In:* A.,P.M. Lockwood (Ed). Effect of Pollutant on Aquatic Organisms. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hughes, G.M., 1976.** Polluted fish physiology, p. 163-184. *In:* A.,P.M. Lockwood (Ed). Effect of Pollutant on Aquatic Organisms. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hughes, G.M., 1981.** Effects of low oxygen and pollution on the respiratory system on fish, p. 121-146. *In:* A.D. Pickering (Ed). Stress and Fish. Academic Press. Ltd. London
- Hutchinson, V.H., 1957.** Critical thermal maxima in salamanders. *Physiological Zoology*, 34:92-125.
- Hutchinson, V.H. y J.D. Maness, 1979.** The role of behaviour in temperature acclimation and tolerance in ectotherm. *American Zoology*, 19:367-384.
- Jobling, M., 1981.** Temperature tolerance and the final preferendum rapid methods for the assessment of optimum growth temperatures. *Journal of Fish Biology*, 19: 439-455.
- Jobling, M., 1993.** Bioenergetics: feed intake and energy partitioning p. 1-44. *In:* J.C. Ranking and F.B. Jensen (Eds). Fish Ecophysiology. Chapman and Hall, London.
- Jobling, M., 1994.** Fish Bioenergetics. Chapman and Hall, London.
- Kellog, R. L., y J.J. Gift, 1983.** Relationship between optimum temperatures for growth and preferred temperatures for the young of four fish species. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112: 424-430
- Koeman, J.H., 1991.** From comparative physiology to toxicological risk assessment. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C:7-10.
- Kutty, M.N. G. Murugapoopathy y T.S. Krishnan, 1971.** Influence of salinity and temperature on the oxygen consumption in young juveniles of the Indian prawn *Penaeus indicus*. *Marine Biology*, 11:125-131.
- Layne Jr. J.R., D.L. Claussen y D. L. Maniss, 1987.** Effects of acclimation temperature, season and time of day on the critical thermal maxima and minima of the crayfish *Orconectes rusticus*. *Journal of Thermal Biology*, 12:183-187,

- León, T., C. Vanegas y S. Espina, 1991.** Efecto de la salinidad sobre el balance energético de juveniles de *Penaeus aztecus* en condiciones controladas: 20°C. XIII Congreso Nacional de Zoología. Mérida, Yucatán, México. Octubre 25-29 de 1991.
- Mann, K.H., 1982.** Ecology of Coastal Waters. A System Approach. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Moreira, G.S., J.C. McNamara y P.S. Moreira, 1982.** The effect of salinity on the metabolic rates of some palaemodid shrimp larvae. *Aquaculture*, 29: 95-100.
- Nelson, D.H., y D.K. Hooper, 1982.** Thermal tolerance and preference of the freshwater shrimp *Palaemonetes kadiakensis*. *Journal of Thermal Biology*, 7:183-187.
- Newell, R.C., 1978.** Factors controlling metabolic capacity in marine invertebrates, p 111-127. In: F.J. Vernberg (Ed). *Physiological Ecology of Marine Organisms*. The Belle W Baruch Library in Marine Science. No. 3 University of South Carolina Press. Columbia South Carolina.
- Odum, E.P., 1953.** Fundamentals of Ecology. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Paladino, F.V., J.R. Spotilla, J.P.Schubauer y K.T. Kowalski, 1980.** The critical thermal maximum; a technique used to elucidate physiological stress and adaptation in fishes. *Review of Canadian Biology*, 39: 115-122.
- Patin, S. A., 1982.** Pollution and the Biological; Resources of the Ocean. Butterworth Scientific. London.
- Peterson, C.H., y S.R. Fegley, 1986.** Seasonal allocation of resources to growth of shell, soma and gonads in *Mercenaria mercenaria*. *Biological Bulletin*, 171: 597-610.
- Pickering, A.D., 1981.** Introduction: the concept of biological stress, p.1-7. In: A.D. Pickering (Ed). *Stress and Fish*. Academic Press. Ltd. London.
- Peusner, L., 1974.** Concepts in Bioenergetics. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Prossel, C.L., 1991.** Environmental and Metabolic Animal Physiology. Wiley-Liss Pub. New York.
- Rand, G.M., y S.M. Petrocelli, 1985.** Fundamental Aquatic Toxicology: Methods and Applications. Hemisphere Pub. Co. Washington.
- Rao, K. P., 1958.** Oxygen consumption as a function of size and salinity in *Metapenaeus monoceros* Fab. from marine and brackish-water environments. *Journal of Experimental Biology*, 35:307-313.
- Reynolds, W.W., y M.E. Casterlin, 1979.** Behavioral thermoregulation and the "final preferendum paradigm". *American Zoology*, 19:211-224.
- Scelso, M.A., y O. Zúñiga, 1987.** Consumo de oxígeno en el camarón *Penaeus brasiliensis* en relación con la salinidad y temperatura, p. 201-215. In: Mem. de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Estación de Investigaciones Marinas de Margarita. Fundación la Salle de Ciencias Naturales. Venezuela.
- Schreck, C.B., 1981.** Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors, p. 292-321. In: A.D. Pickering (Ed). *Stress and Fish*. Academic Press. Ltd. London.
- Schreck, C.B., 1990.** Physiological behavioral and performance indicators of stress. p. 29-37. In: S. M. Addams (Ed) *Biological Indicators of Stress in Fish*. American Fisheries Society Symposium, Bethesda, Maryland.
- Subrahmanyam, C.B., 1990.** Tidal and diurnal rhythm of locomotory activity and oxygen consumption in the pink shrimp, *Penaeus duorarum*. *Contributions to Marine Science*, 20: 123-132.
- Thomas, P., 1990.** Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. p. 9-28. In: S. M. Addams (Ed) *Biological Indicators of Stress in Fish*. American Fisheries Society Symposium, Bethesda, Maryland.
- Townsend, C.R., y P. Calow, 1981.** *Physiological Ecology. An Evolutionary Approach to Resource Use*. Blackwell Sc. Pub. Oxford.
- Underwood, A.J., y C.H. Peterson, 1988.** Toward and ecological framework for investigation pollution. *Marine Ecology Progress Series*, 46: 227-234.
- Vanegas C., 1988.** Preferendum final de temperatura y tolerancia térmica del camarón café *Penaeus aztecus* Ives. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias UNAM.
- Vanegas C., S. Espina, y A. Sánchez, 1990.** Determinación de las respuestas fisiológicas y de comportamiento del camarón *Penaeus aztecus* Ives, a la temperatura. II Congreso de Ciencias del Mar. La Habana, Cuba. Junio 18-22 de 1990. Res. BM-163M.
- Vanegas C., 1992.** Efecto de la salinidad y de la temperatura sobre el balance energético de juveniles del camarón café *Penaeus aztecus* Ives (Crustácea: Decapoda). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias UNAM.

- Vanegas C., S. Espina, C. Rosas y A. Sánchez, 1993.** Estrés producido por los factores ambientales en *Penaeus aztecus* Ives (Crustácea: Decapoda). Mem del Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar. La Paz, B.C.S. México. Septiembre 27 a octubre 1 de 1993. Res. C-234.
- Vanegas C., X. Chiappa y S. Espina, 1995.** Influence of temperature and salinity upon respiration and excretion rates of *Penaeus setiferus* (Crustácea: Decapoda). (En preparacion).
- Venkataramiah, A., G.J. Lackshmi y G. Gunter, 1974.** Studies on the effects on the salinity and temperature on the commercial shrimp, *Penaeus aztecus* Ives, with especial regards to survival limits, growth, oxygen consumption and ionic regulation. Gulf Coastal Research Laboratory. Ocean Springs, Misissippi, 134 p.
- Vernberg, F.J., y W.B Vernberg, 1991.** Adaptation of extrem ambients, p. 165-180. In: F.J. Vernberg (Ed). Physiological Ecology of Marine Organisms. The Belle W. Baruch Library in Marine Science No. 3 University of South Carolina Press. Columbia South Carolina.
- Weber, C.I., 1981.** Evaluation of the effects on the aquatic life in receiving waters. An overview, p. 3-13. In: J.M. Bates y C.I. Weber (Eds). Ecological Assessment to Effluent on Communities of Indigenous Aquatic Organisms. ASTM, American Society for Testing and Materials.
- Wedemeyer, G.A., y D.J. McLeay, 1981.** Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors, p. 247-275. In: A.D. Pickering (Ed). Stress and Fish. Academic Press. London.
- White, S.L., y P.S. Rainbow, 1986.** A preliminary study of Cu, Cd and Zn, binding component in the hepatopancreas of *Palaemon elegans* (Crustácea: Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 83C:111-116.
- Widdows J., y B.L. Bayne, 1971.** Temperature acclimation of *Mytilus edulis* with reference to its energy budget. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 51: 827-834.
- Widdows J., 1978.** Combined effects of body size, food concentration and season on the physiology of *Mytilus edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 58: 109-124.
- Widdows J., P. Donkin, P.N. Salked, J.J. Ckary, D.M. Lowe, S.V. Evans, y P.E. Thompson, 1984.** Relative importance of environmental factors in determining physiological differences between two populations of mussell (*Mytilus edulis*). *Marine Ecology Progress Series*, 17:33-47.
- Widdows J., y D. Johnson, 1988.** Physiologic energetics of *Mytilus edulis*. Scope for growt. *Marine Ecology Progress Series*, 46:113-121.
- Widdows J, P. Donkin, 1991.** Role of physiological energetics ion ecotoxicology. Mini review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C: 69-75.
- Wiesepape, L.M., D.V. Aldrich y K. Strawn, 1972.** Effects of temperature and salinity on thermal death in postlarval brown shrimp, *Penaeus aztecus*. *Physiological Zoology*. 45:22-33.
- Woo, N.Y.S., y S.F. Chiu, 1994.** Effects of nitrite exposure on growth and survival of sea bass lates calcarifer fingerlings in various salinities. *Journal Applied Aquaculture*, 44: 45-54.
- Yáñez-Arancibia A., 1986.** Ecología de la Zona Costera: Análisis de Siete Tópicos. AGT Editor, S.A. México, D.F. 189 p.
- Zanders, P., 1989.** Problemas metodológicos de resultados durante estudios en los efectos biológicos de contaminación, p. 31-19. In: G de Mahieu y M. Correa (Eds). Taller sobre Efectos de la Contaminación por Metales e Hidrocarburos en Organismos Acuáticos. Universidad Simón Bolívar y Universidad de Oriente, Venezuela.

Espina, S., y C. Vanegas, 2005. Ecotoxicología y contaminación, p. 79-120. *In*: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 p.

Ecotoxicología y Contaminación

Sonia Espina y Cecilia Vanegas

Facultad de Ciencias, UNAM

4

RESUMEN

Se presenta de manera resumida el efecto biológico de los contaminantes más comunes en el medio marino, como metales pesados, petróleo y sus derivados y plaguicidas. Tales efectos enmarcados en el concepto de estrés, se segregan del continuo de las jerarquías biológicas en cuanto a la relevancia ecológica. A través de ejemplos seleccionados de la literatura se destaca que, estudios básicos con diferentes enfoques, pueden llegar a ser útiles para cubrir los objetivos de la ecotoxicología. Asimismo se destaca el hecho que los estudios ecofisiológicos sobre las especies de prueba, son la ruta de entrada a la información más relevante para las comparaciones entre las respuestas normales y las de estrés, aspecto fundamental para las pruebas realizadas con contaminantes en el laboratorio. Aun en esta breve revisión resalta el hecho que una forma de abordar exhaustivamente el problema de la contaminación es a través de la integración de grupos de especialistas en diferentes áreas, con el propósito de analizar la información existente, identificar su relevancia ecológica y generar una base de datos. Se requiere también producir nueva información, a través de estudios cuyos objetivos sean claros y precisos en cuanto al nivel de organización que abordan y a su capacidad de predicción. Integrar estos estudios con la información previa permitirá generar modelos predictivos para establecer normas más reales de protección al hombre así como al ambiente y a sus recursos.

ABSTRACT

The biological effects of common marine pollutant are briefly reviewed including heavy metals, oil and its derivatives and pesticides. These stress effects are segregated through hierarchical levels with respect to ecological relevance. Examples were selected from the scientific literature in order to remark that basic studies which different approaches can be useful for comparison between normal organisms and those stressed from exposure to toxic chemical substances. To deal with the environmental pollution problems the joint action of specialists from different areas, is needed to analyse the current information and identify that with ecological relevance to produce a database. Also is required new information from work that clearly established the specific level of biological information focused and its prediction capacity. From these integrative information it would be possible to generate predictive models for regulations to protect the man, the environment and its resources from toxic effects of contaminants.

INTRODUCCIÓN

Hace más de 200 años nació en España el padre de la toxicología moderna. Mateo José Buenaventura Orfila (1787-1853); químico de origen y medico, enfoco su investigación en los efectos nocivos de las sustancias químicas y en la terapeutica correspondiente; introdujo la metodología cuantitativa en el estudio de las acciones de las sustancias químicas sobre los animales (Loomis, 1982).

La toxicología moderna, separada de la farmacología con la cual mantiene estrecho vínculo, es una ciencia multidisciplinaria ya que requiere conocimientos de la física, de la química, y de la biología básica. Se apoya en la fisiología y en la inmunología; es esencial en la sanidad pública y engloba la patología. Loomis (1982) considera que la farmacología, por una parte y la patología por otra, forman parte de la toxicología.

El autor define esta ciencia como “el estudio de las acciones nocivas de las sustancias químicas sobre los mecanismos biológicos” y menciona que se ha desarrollado en tres áreas principales: forense, económica y ambiental. Cada una de estas áreas tiene sus propios requisitos académicos, sus objetivos de investigación y sus toxicólogos especialistas.

La toxicología ambiental o ecotoxicología, señala Loomis, es una rama de la toxicología que “se ocupa de la exposición incidental de los tejidos a productos químicos contaminantes del ambiente, de los alimentos o del agua y estudia las causas y efectos, las condiciones y los límites de seguridad de tal exposición”. Específicamente se refiere a la salud humana.

Otros autores extienden la definición de ecotoxicología; hacen referencia de que es una ciencia multidisciplinaria que estudia el efecto de las sustancias químicas antropogénicas sobre los ecosistemas (Jepson, 1990; Brower *et al.*, 1990; Bierkens y Simkis, 1990; Seitz y Ratte, 1991).

Por su amplitud, esta definición dista mucho de ser operativa ya que no especifica en cual nivel de organización biológica se centrará el estudio. Jepson (1990) destaca lo anterior y

señala que, para el ecotoxicólogo, el desafío principal es mantener la meta general en tanto “se establecen los principios y enfoques que permitan visualizar los efectos de los contaminantes desde el nivel subcelular hacia los niveles de organización biológica superior (ecosistema), para hacer posible su interpretación en un contexto ecológico.

Es precisamente en esta apreciación que hace Jepson (1990), donde se puede detectar el estrecho vinculo que existe entre la ecotoxicología, puesto que la carencia de la primera es la esencia de la segunda. Los estudios ecofisiológicos se centran en el organismo y sus respuestas, detectables ante un cierto complejo ambiental, se interpretan a nivel suborganismo sin dejar de considerar que el organismo pertenece a una población, la cual forma parte de una comunidad, que a su vez esta integrada a un ecosistema determinado (Fig. 1).

Son evidentes los traslapes existentes entre la ecofisiología y la ecotoxicología, lo que varía principalmente es el énfasis que ponen los diversos investigadores en uno u otro enfoque.

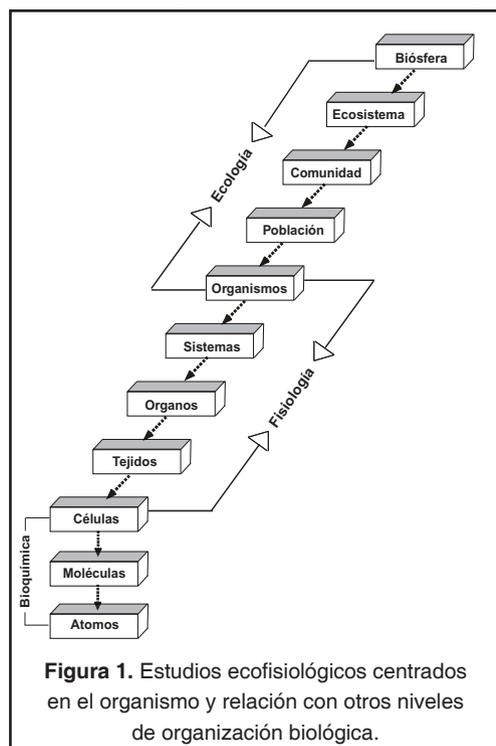


Figura 1. Estudios ecofisiológicos centrados en el organismo y relación con otros niveles de organización biológica.

En tanto que el ecotoxicólogo profundiza en torno a las sustancias tóxicas que se encuentran en el ambiente, el ecofisiólogo estudia al contaminante solo como otras de las múltiples variables que constituyen el ambiente y que afectan al organismo.

En la literatura existen acepciones ligeramente diferentes sobre los conceptos de contaminantes y contaminación. Siendo la de GESAMP (1980) una de las más amplias. Al respecto, Albert (1988) refiere "que los contaminantes del ambiente son todas las formas de materias que exceden las concentraciones naturales en un momento y en un lugar determinado donde producen efectos adversos". Sin embargo, la energía calórica asociada a las plantas termoeléctricas también es una forma de contaminación. Así, "tanto la materia y la energía que se liberan al medio en cantidades mayores a las que éste puede asimilar sin experimentar degradación, desde la perspectiva antropogénica" son causantes de contaminación ambiental (Freedman, 1989).

El concepto de toxicidad se refiere a la propiedad de una sustancia de producir daño (Loomis, 1982). Si la toxicidad es aguda, en el término esta implícita la muerte del animal a causa del deterioro producido por la sustancia tóxica. Si la toxicidad es crónica podrá sobrevivir hasta que rebase el límite de su capacidad homeostática.

Para que el tóxico produzca tales efectos debe ser incorporado al organismo. Los grados de toxicidad son función de los niveles que alcance en los tejidos del animal; estos niveles se relacionan con la concentración del compuesto en el medio, lo cual depende tanto del tipo de contaminante como del organismo y también del tiempo de exposición.

Existe en la actualidad un gran volumen de información sobre los efectos biológicos de los contaminantes, entre los que destacan los referentes a la toxicidad aguda y en menor grado los de toxicidad crónica.

En los sistemas naturales la toxicidad aguda que experimentan los organismos es producida, generalmente por descargas de contaminantes ocurridas accidentalmente (derrames de petróleo) y por lo tanto es puntual y de corta

duración, aunque puede tener efectos dañinos a largo plazo. La exposición crónica se debe a las descargas constantes de sustancias tóxicas en dichos sistemas. En este sentido, es conveniente conocer el efecto de los contaminantes en concentraciones subletales crónicas, donde el organismo sobrevive pero la efectividad de sus funciones se reduce, lo cual puede implicar un impacto ecológico importante.

En los estudios ecotoxicológicos el concepto de estrés es inherente. Bayne *et al.* (1976) definen estrés como "una alteración medible del estado estable fisiológico (bioquímico, celular o conductual) inducido por un cambio ambiental que hace al individuo (población o comunidad) más vulnerable a nuevos cambios ambientales". Para Pickering (1981) todas las definiciones de estrés concuerdan en que son reacciones que se desvían de la normalidad cualitativa y cuantitativamente. También menciona que existe acuerdo en clasificar las respuestas de estrés en primarias, secundarias y terciarias.

Las primarias engloban las respuestas nerviosas y neuroendocrinas (producción de catecolaminas y esteroides), en tanto que las secundarias -consecuencia de las anteriores- incluyen respuestas tanto fisiológicas como a nivel bioquímico, entre las que se incluyen alteraciones en la química sanguínea, del daño tisular y las perturbaciones en diversas funciones metabólicas. Las respuestas terciarias, derivadas de las secundarias, engloban alteraciones en la función osmorreguladora e inmunológica, disminución del crecimiento, modificación del comportamiento migratorio y reproductivo y reducción de la habilidad para tolerar estresores ambientales adicionales, lo cual en grado último causa la muerte del organismo.

A nivel poblacional, los efectos terciarios de estrés se manifiestan en la reducción del éxito reproductivo, la disminución del reclutamiento y el crecimiento de las poblaciones lo que también repercuten negativamente en la abundancia y en la diversidad de las especies (Wedemeyer y McLeay, 1981).

Las sustancias químicas xenobióticas son aquellas sintetizadas por el hombre (Albert, 1988). Estos compuestos ingresan por diversas vías al ambiente acuático donde producen

estrés biológico. Es conveniente recalcar que la respuesta del estrés es una respuesta integrada que comprende aspectos de todos los niveles de organización hasta organismo y por tanto incluye facetas correspondientes a todos los niveles del arreglo convencional mencionado por Pickering (1981).

Al respecto Heath (1990) refiere que es posible crear "un método taxonómico" para medir el estrés, en el cual incorpora variables bioquímicas y moleculares, fisiológicas y morfológicas y variables ecológicas. En un estudio ecotoxicológico se aumentara considerablemente el poder de los indicadores biológicos, señala, si se seleccionan dichas variables a tantos niveles de organización como sea posible. En el mismo sentido, Schreck (1990) pone énfasis en la necesidad de conocer los intervalos normales de estas respuestas en el campo, así como los efectos acumulativos y sinérgicos de los estresores ambientales.

El enfoque de indicadores biológicos de estrés, facilita las mediciones de las características particulares de organismos, poblaciones y comunidades y aun con todas sus reconocidas limitaciones permite evaluar y predecir los cambios ambientales generados por los xenobióticos que producen estrés, antes de que se manifiesten a nivel de población o comunidad (Thomas, 1990). El autor cita que la expresión del estrés en los diferentes niveles de organización biológica "tiene explicación mecanicista en el nivel inferior y ejerce su influencia en el nivel superior".

El enfoque de los indicadores biológicos disminuye la amplitud de la brecha entre los estudios controlados de laboratorio y los realizados en el campo. Esto se refiere a la determinación de las relaciones causales entre las mediciones de indicadores seleccionados en cada nivel jerárquico; así una vez que estas se conozcan es posible predecir los efectos a largo plazo (Thomas, 1990).

En la literatura se mencionan diferentes tipos de indicadores, tanto a nivel molecular y bioquímico (Shugart *et al.*, 1987; Voogt *et al.*, 1987; Thomas, 1990; Roesijadi, 1992; Viarengo y Nott, 1993; Reddy y Fingerman, 1994) como a nivel tisular (Hinton y Lauren, 1990; Battaglini *et al.*, 1990) y a nivel fisiológico y conductual,

como las pruebas de desafío (Schreck 1990) y la medición del balance energético (Widdows y Donkins, 1991).

A su vez los indicadores biológicos se clasifican en indicadores de exposición a contaminantes ambientales, indicadores de efecto producidos por estos e indicadores de susceptibilidad a los compuestos tóxicos. Entre los primeros se incluyen el daño e interferencia provocados por los contaminantes, en procesos mediados por enzimas, así como los efectos deletéreos a nivel genético, sobre el DNA. Entre los marcadores de efectos se engloban todos aquellos que se manifiestan en deterioro de la condición fisiológica (salud) del organismo. Los marcadores de susceptibilidad indican "diferencias individuales o poblacionales que afectan las respuestas ante los factores del medio independientemente de la exposición a los contaminantes en estudio" (Koeman, 1991).

Con base en las respuestas obtenidas de los estudios enfocados en marcadores de efecto y de susceptibilidad, es posible identificar las especies que, en principio, sean vulnerables a ciertos compuestos químicos, identificar y explicar las respuestas de los organismos y predecir los efectos que tendrían lugar en medio natural a mas largo plazo. Esto destaca la relevancia ecológica de tales estudios, por una parte y por otra, la integración de las investigaciones ecofisiológicas y ecotoxicológicas.

En este capítulo se presenta de manera resumida el efecto biológico de los contaminantes más comunes en el medio marino, como metales pesados, petróleo y sus derivados y plaguicidas. Tales efectos enmarcados en el concepto de estrés, se segregan del continuo de las jerarquías biológicas. A través de los ejemplos, seleccionados de la extensa literatura sobre el tema de la ecotoxicología, se intenta destacar que estudios básicos con diferentes enfoques pueden llegar a ser útiles para cubrir los objetivos de esta ciencia; esto es si se establecen las relaciones causales de las respuestas obtenidas desde niveles suborganismo a organismo y desde éste a las comunidades y ecosistemas. Asimismo se destaca el hecho que los estudios ecofisiológicos sobre las especies de prueba, son la ruta de entrada a la información más relevante para las comparaciones entre las respuestas normales y las de estrés,

fundamentales para las pruebas de desempeño y desafío realizadas con contaminantes, en el laboratorio. En el campo, se han utilizado con éxito, en estudios comparativos entre el medio no contaminado y el alterado por la presencia de sustancias xenobióticas.

Aun en esta breve revisión resalta el hecho que una forma de abordar exhaustivamente el problema de la contaminación es a través de la integración de grupos de especialistas en las diferentes áreas de la química. Bioquímica, ecofisiología y ecología, y de científicos abocados a las ciencias computacionales, con el propósito de analizar la información existente e identificar aquella de relevancia ecológica, a fin de generar una base de datos. Se requiere también producir nueva información, de estudios cuyos objetivos sean claros y precisos en cuanto al nivel de organización en el que se centren y con respecto a la capacidad de pre-

dicción que se pretenda. Integrando esta a la anterior, se podrían generar modelos predictivos para establecer normas más reales de protección del ambiente.

Estamos concientes que lo anterior requiere comprender que la organización biológica, tan incorporada al quehacer del investigador en ciencias ambientales, también existe a nivel humano. Esto es, reconocer que existen jerarquías sociopolíticas; el desafío está en traspasar la brecha existente entre ambas, trascendiendo desde la información biológica hasta las estructuras de poder donde se toman las decisiones. La defensa del ambiente debería ser prioritaria en nuestros países, en vías de desarrollo, pero para que la protección de los recursos sea realidad, se necesitan los recursos que proporcionarían las jerarquías de nivel superior.

PRUEBA DE TOXICIDAD

El conocimiento del efecto tóxico de las sustancias químicas sobre la biota acuática, es especialmente importante cuando se trata de resguardar las especies y los ecosistemas.

En el pasado, los criterios de las pruebas para determinar los efectos adversos de los contaminantes, se basaron en la muerte de los organismos. Sin embargo, la sobrevivencia observada luego de la exposición a una sustancia tóxica, no es sinónimo de inocuidad. Si por una parte se toma en cuenta la intensidad de un cierto factor o la concentración de un contaminante determinado y por otra, el tiempo que un organismo permanece bajo su acción, se pueden reconocer diferentes etapas en la respuesta del sistema biológico expuesto al contaminante.

Como se muestra en la figura 2, la primera etapa es el estado estable fisiológico del organismo; la segunda, es su alteración con un costo metabólico alto y la tercera etapa se presenta cuando se rebasan los límites de la compensación fisiológica. En esta última, hay una perturbación del estado original, debido a los mecanismos de resistencias que le permiten compensar el estrés producido por el contaminante; esto ocurre en concentraciones bajas

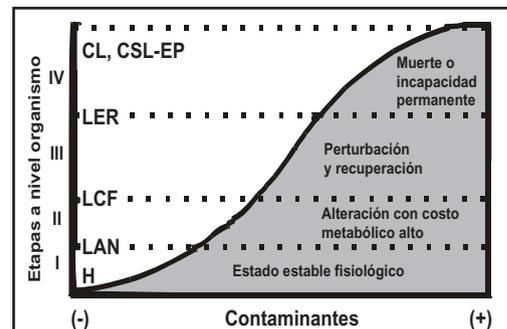


Figura 2. Etapas de las respuestas de organismos expuestos a contaminantes. H: homeostasis; LAN: límite de los ajustes normales; LCF: límite de la compensación fisiológica; LER: límite de ajustes reversibles en exposiciones de plazo corto; CL: concentraciones letales; CSL-EP: concentraciones subletales en exposiciones prolongadas. (Modificado de Salibián, S. Espina).

del tóxico o en concentraciones altas pero por lapsos cortos. Aun puede presentarse una última etapa, la cual se manifiesta cuando la descompensación es en tal magnitud o persistencia que los mecanismos homeostáticos ya no son capaces de mantener un estado estable fisiológico compatible con la vida, determinando así, la muerte del organismo.

Las pruebas de toxicidad pueden presentar deficiencias, las cuales se manifiestan cuando se utiliza la concentración letal media de un contaminante (CL_{50}), en exposiciones de 96h, cuando las descargas son continuas (Gray, 1974; Handy, 1994).

Las pruebas agudas también pueden ser inconvenientes cuando se efectúan en organismos de niveles tróficos superiores bajo condiciones que corresponden a niveles inferiores más sensibles; cuando el estudio se centra en los adultos siendo las larvas y los juveniles más vulnerables y también cuando las sustancias químicas se prueban aisladamente, ya que en el medio natural se presentan en mezclas.

Otra posible deficiencia de las pruebas de toxicidad aguda, es el desconocimiento del intervalo de tolerancia del organismo de prueba a los cambios ambientales naturales. Sin este conocimiento no es posible asegurar que los niveles de toxicidad observados se deban al contaminante y no a la combinación de factores a la cual se encuentran expuestas los especímenes.

Las pruebas de toxicidad, tanto agudas como crónicas, se llevan a cabo frecuentemente en especies aisladas y se realizan con unos o pocos agentes tóxicos, aunque su propósito sea la protección de los seres vivos en los sistemas naturales. Asimismo, son escasos los estudios que consideran las condiciones óptimas del medio para una especie de prueba, como la temperatura, la salinidad, la concentración del oxígeno disuelto en el agua, la luz y el pH. Dichas variables afectan tanto el comportamiento del espécimen en función de la estacionalidad, como la toxicidad del contaminante.

En el extenso estudio que realizaron sobre larvas y adultos del cangrejo estuarino *Uca pugnator*, Vernberg *et al.* (1974), destacan la necesidad de conocer los efectos sinérgicos de los contaminantes y las fluctuaciones naturales ambientales. Otros autores, por su parte, destacan el antagonismo y el sinergismo, la acumulación y la toxicidad de los metales modificados por los factores ambientales (Thurberg *et al.*, 1973; Caldwell, 1974; Gray, 1974; Phillips, 1976; Frank y Robertson, 1979; Rosemberg y Costlow, 1976; Bjerregaard y Depledge, 1994).

En este sentido, se ha mencionado que sustancias químicas como los derivados del petróleo, se degradan en el medio marino y que la velocidad de los diversos procesos involucrados dependen de las condiciones ambientales prevalecientes, entre las cuales se citan la temperatura, la concentración de oxígeno, la amplitud de la actividad fotoquímica y la disponibilidad de nutrientes, para los microorganismos que degradan los hidrocarburos (Botello *et al.*, 1992).

También es importante señalar el hecho que ciertas especies pueden aclimatarse a los contaminantes lo que produce sesgos en las determinaciones de las concentraciones letales cuando se emplean en organismos cuya procedencia se desconoce.

Con la experiencia la estrategia se ha diversificado. Ahora se toma en cuenta además de la muerte y de la bioacumulación de sustancias tóxicas, los efectos sobre sistemas fisiológicos específicos. Por ejemplo, se determina la influencia de concentraciones relativas de los tóxicos, tanto sobre las estructuras subcelulares (enzimas) y celulares, como sobre los tejidos y los órganos e inclusive sobre las vías de captación y de detoxificación. Asimismo, se incluyen las mediciones de la regulación osmótica y los modelos de comportamiento, el crecimiento y la reproducción de los organismos en el medio alterado y la adaptación de los especímenes a niveles bajos o crónicos de los contaminantes (Duke y Dumas, 1974; Howell, 1976; Lockwood, 1976).

A pesar de la diversidad de enfoques, en la mayor parte de este tipo de estudios se requiere conocer la concentración del contaminante que produce el efecto y aquella que no produce ningún efecto y también, el tiempo durante el cual el organismo no reacciona a la exposición de concentraciones subletales o crónicas del contaminante. Lo anterior pone de manifiesto la variabilidad de sus respuestas.

Al respecto se ha enfatizado la necesidad de cuantificar la concentración del contaminante en el medio, con el fin de establecer una relación dosis-respuesta. Dicha relación es indispensable para elaborar modelos que permitan predecir la acción del tóxico e instrumentar medidas preventivas (Howell, 1976; Widdows y Donkin, 1991).

Otro elemento de relevancia fundamental en las pruebas de toxicidad, es el organismo con el cual se trabaja. Uno de los criterios más amplios que se emplea para la selección de especímenes a utilizar en las investigaciones ecotoxicológicas es el que proporciona el manual de Programa Ambiental de las Naciones Unidas (UNEP, 1986). Este indica que cualquier pez o macroinvertebrado puede ser utilizado, dependiendo del propósito del experimento.

Sin embargo, este manual excluye los microorganismos y también ciertos contaminantes como el petróleo, sus derivados y dispersantes, por lo que no se considera que los organismos considerados sean los únicos que se deban utilizar en una prueba de toxicidad. En cambio, se deben de tomar en cuenta las recomendaciones que en el manual se hacen sobre la conveniencia de utilizar, hasta donde sea posible, organismos de tallas similares y que además, provengan de áreas no contaminadas.

Otros criterios contemplan una serie de organismos asociados a concepto tales como formas y especies sensibles, especies clave, especies blanco, indicadores biológicos, integradores de contaminación y blancos ecológicos.

Especies Sensibles

La consideración de especies sensibles a los tóxicos ambientales, implica que si estas existen también deben haber intervalos de sensibilidad y existir especies tolerantes. Se ha mencionado que cuando se trata de la protección de los organismos acuáticos, es necesario conocer el efecto de los tóxicos sobre las especies más sensibles, así como los estadios más sensibles de su ciclo de vida, a la vez que se destaca que estas especies son las más adecuadas para detectar las primeras etapas del deterioro en un ecosistema (Gray, 1974; Waldichuk, 1974).

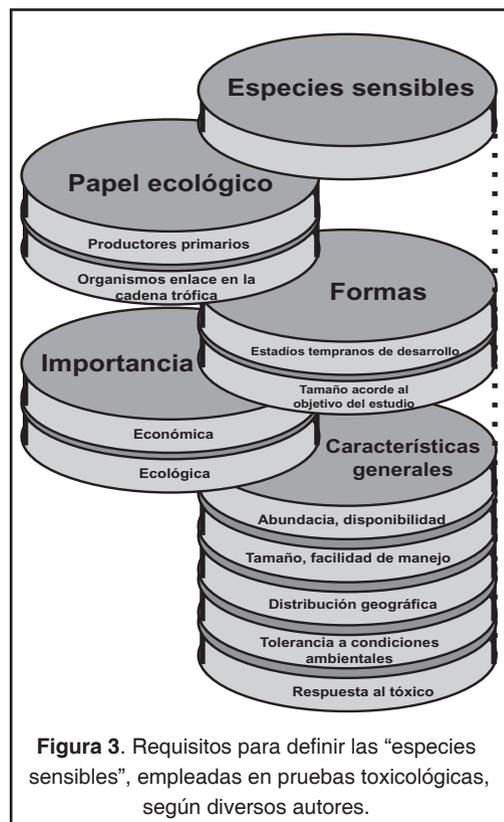
Entre las especies sensibles se incluyen los organismos planctónicos de niveles tróficos inferiores y entre las formas sensibles, los estadios de desarrollo temprano de las especies planctónicas y nectónicas. Al respecto, Patin (1982) señala que los productores primarios como el fitoplancton, se podría considerar un

blanco ecológico de los contaminantes en el medio natural, debido a que su actividad fotosintética es altamente sensible aun en bajas concentraciones de contaminantes. También considera como blancos ecológicos las formas embrionarias y larvales de la mayor parte de la fauna marina, ya que son sensibles a los tóxicos a la vez que actúan como concentradores de contaminantes.

Con los metales pesados se ha observado que existen diferencias marcadas en la reacción de diferentes poblaciones lo cual se atribuye a los grados de tolerancia de los organismos a este tipo de contaminantes. Varios mecanismos capacitan a las especies tolerantes para enfrentar el estrés producido por la presencia de las sustancias químicas tóxicas. Bryan (1976) hace referencia a la disminución de la permeabilidad corporal y al aumento de la excreción en relación al zinc; a mejores sistemas de detoxificación a través de la superficie del cuerpo y de órganos excretores con respecto al cobre y probablemente en lo que respecta a la plata y el arsénico. El autor agrega, que por lo menos en el caso del cobre, la diferencia entre las especies tolerantes y las sensibles es genética.

Recientemente, se ha mencionado que las diferencias entre los diversos tipos de organismos se pueden medir con base en el grado de adecuación que presenta a un determinado ambiente. Tal adecuación estaría representada por el aumento de la tasa metabólica, lo cual se manifestaría solamente en presencia del tóxico, en las formas tolerantes. En el medio alterado, se desencadenarían los mecanismos de resistencia de la especie tolerante, reflejados en dicho aumento, lo cual conduciría a una disminución de la energía potencial de crecimiento, pero aumentaría sus oportunidades de sobrevivencia (Calow y Sibly, 1990).

Las características recomendables para "especies sensibles" a utilizar en las pruebas de toxicidad, están ampliamente citadas en la literatura. Entre ellas se incluyen: tener una amplia distribución geográfica; ser abundantes y de fácil disponibilidad; tener tamaño suficiente mente grande por conveniencia en el trabajo experimental; ser comunes; así como sensibles a la contaminación y tolerantes a un amplio intervalo de condiciones ambientales (Fig. 3).



Sin embargo, otros científicos proponen que la selección debe basarse en especies claves dentro de la organización de la comunidad o por su participación como enlaces en las cadenas tróficas que conducen a consumidores de importancia económica (Waldichuk, 1974; Patin, 1982; Underwood y Peterson, 1988).

También hay cierta discrepancia en lo concerniente a las especies que habitan los sistemas lagunares-estuarinos, debido a su amplia tolerancia fisiológica ante los cambios ambientales, característicos de estos sistemas. Gray (1974) argumenta que dicha tolerancia podría preadaptar a los organismos para resistir el estrés de la contaminación y por lo tanto no serían adecuados. Propone especies sensibles de larga vida, con poca capacidad de adaptación, como aquellas provenientes de medios estenotípicos. Asimismo señala que las especies tolerantes constituyen un problema cuando se efectúan pruebas de toxicidad, aunque el organismo seleccionado sea fácil de cultivar. Por ejemplo, la lapa *Patella vulgata* no sería adecuada porque es capaz de vivir con altas concentraciones de cadmio en sus tejidos.

En contraste Underwood y Peterson (1988) opinan que las especies más sensibles, serían aquellas que en condiciones naturales experimentan estrés y por lo tanto sucumbirían rápidamente al nuevo estrés impuesto por el contaminante. En el mismo sentido Vernberg *et al.* (1974) argumentan que la combinación de concentraciones subletales de contaminantes con un cambio estresante del medio, sería letal para los animales que habitan el estuario. Otros autores proponen el uso de especies nativas (Buikema *et al.*, 1982) las cuales pueden ser adecuadas para obtener información acerca de un sitio específico.

En cuanto a la contaminación, Patin (1982) ha hecho notar que no existen datos suficientes para identificar grupos de organismos, estadios del desarrollo o enlaces entre cadenas alimenticias para asociarlos al concepto de blancos ecológicos, aunque los productores primarios podrían quedar incluidos en esta categoría.

Por su capacidad para acumular metales pesados del ambiente, los bivalvos están ampliamente reconocidos como indicadores biológicos de este tipo de contaminación. Entre ellos, *Mytilus edulis* se reconoce como un buen integrador (Coleman *et al.*, 1986). Los autores distinguen estas características como dos aspectos concernientes a la cuantificación de la contaminación.

El primero se refiere al grado de contaminación relativa, empleada para comparar niveles de concentración de metales en los tejidos del mejillón de diversas áreas y el segundo, a la tasa de acumulación de los metales que se usa para calcular los niveles de concentración en el medio. Ambos aspectos, según estos investigadores requieren que el bivalvo funcione como un integrador; esto es, que exista una relación simple y constante entre el nivel de concentración del metal en los tejidos y posniveles promedio en el ambiente. Argumentan que *Mytilus edulis* por una parte, cierra sus valvas aislándose del medio en presencia de concentraciones altas de los metales y por otra, que varios factores modifican la acumulación como son la disponibilidad del alimento, la interacción entre los metales y la presencia de agentes quelantes. Además, encontraron que la tasa de acumulación del cadmio en los tejidos del mejillón, variaba con el régimen de administración del

contaminante. Por lo anterior, difícilmente se trata de una relación simple entre el animal y el promedio de las concentraciones de metales en el medio. Sin embargo, otros autores opinan que la especie es un indicador adecuado de la contaminación ambiental (Viarengo y Canesi, 1991).

En lo referente al control de la contaminación, D'Agostino y Finney (1974) consideran que buscar métodos o especies estándares, que

sirvan para identificar los efectos de los contaminantes sobre todas las especies en todos los ambientes, es muy poco realista. Tal vez, cada investigador debiera seleccionar el organismo adecuado para su tipo de estudio acorde a sus objetivos, sin olvidar que existen especies, poblaciones y enlaces entre las cadenas alimentarias, particularmente sensibles a los contaminantes. También es necesario recordar que no todas las pruebas sirven a todo propósito de igual manera.

NATURALEZA DE LA INVESTIGACIÓN

Como marco conceptual de las investigaciones ecotoxicológicas, es relevante considerar las jerarquías biológicas de organización (Jepson, 1990). Así, un importante objetivo de la ecotoxicología, es la búsqueda de índices de estrés cuantitativos a nivel celular y subcelular en relación al impacto de los contaminantes. Otro aspecto del mismo problema lo aborda la ecofisiología la cual centra el estudio a nivel organismo aunque necesita explicar sus respuestas, recurriendo a las investigaciones realizadas a nivel suborganismo.

Esto se debe a que se conoce que la toxicidad inducida por las sustancias químicas tiene su origen en la interrupción de la secuencia de eventos bioquímicos que abarcan tanto procesos fisiológicos fundamentales del animal, como sus sistemas de control.

Dichos procesos comprenden el crecimiento, la reproducción, la osmoregulación y el balance energético. Los sistemas de control incluyen los sistemas nervioso y endocrino. Estos sistemas forman parte importante de la respuesta global del organismo que lo capacita para enfrentar las situaciones adversas. La interferencia de los contaminantes en los procesos fisiológicos necesariamente redundará en efectos deletéreos sobre las jerarquías superiores de organización, ya sea en las variables poblacionales o en las características propias de las comunidades, lo cual incidirá, necesariamente, en los ecosistemas. Por lo tanto es necesario discutir el impacto de ciertos contaminantes, dentro del marco conceptual de las categorías biológicas.

Nivel Suborganismo

En el campo bioquímico las investigaciones ecotoxicológicas, también existen jerarquías tales como los niveles submoleculares, moleculares, celulares y tejidos componentes de órganos. Las respuestas bioquímicas y moleculares han sido consideradas como "indicadores tempranos" del deterioro ambiental ya que son las primeras que se desencadenan por efecto de los estresores ambientales incluidos los tóxicos (Wedemeyer y McLeay, 1981). Thomas (1990) señala que tales respuestas poseen algunas de las características ideales de un indicador biológico adverso de los tóxicos como es la respuesta rápida en el tiempo, una alta sensibilidad a la presencia de xenobióticos aun en concentraciones subletales y que a menudo la magnitud del cambio bioquímico esta relacionada con la severidad del tóxico.

Como se conoce que los cambios a nivel molecular preceden a otras respuestas del organismo ante los estresores ambientales, se han considerado como indicadores sensibles de las perturbaciones del medio. Entre estos los daños producidos en el DNA han sido propuestos como parámetros útiles en la detección de sustancias carcinógenas y mutagénicas, como la radiación de ciertos agentes químicos. Shugart (1990) menciona que las pruebas de genotoxicidad permiten detectar y cuantificar la pérdida de integridad del DNA entre las que se incluyen un exceso de rupturas en las cadenas inducidas por lo tóxicos, así como la presencia de nucleótidos aberrantes. En teleósteos se han

observado alteraciones del DNA provocadas por metabolitos del benzo (a) pireno y otros xenobióticos, lo cual se asocia a tumoración (Shugart *et al.*, 1987; Thomas, 1990; Lemaire *et al.*, 1992).

En los estudios de contaminación los mecanismos bioquímicos endocrinológicos son determinantes en la sobrevivencia de las poblaciones. Un ejemplo conspicuo es la interferencia de los tóxicos en los niveles plasmáticos de estrógenos y progesterona de los vertebrados marinos y en la secreción de gonadotropinas que regulan la síntesis de dichas hormonas. Es evidente que tal interferencia puede repercutir en una disminución del éxito reproductivo de las especies (Brower *et al.*, 1990).

Los plaguicidas policlorados, derivados del DDT, y los bifenilos policlorados ejercen una acción competitiva al unirse a los receptores celulares de estrógenos tanto en mamíferos como en aves; evidencias preliminares sugieren que el efecto inhibitorio de estos xenobióticos, observados en peces, podría ocurrir mediante mecanismos similares (Thomas, 1990). En la estrella de mar *Asteria rubens*, se ha observado que el cadmio y el zinc alteran el metabolismo normal de los esteroides; aunque los mecanismos de acción de los metales se desconocen, es probable que la interferencia tenga lugar a nivel de la síntesis de las enzimas comprendidas en el proceso (Voogt *et al.*, 1987). Cuando los agentes tóxicos interfieren la acción de las hormonas tiroideas, las consecuencias adversas se manifiestan en el crecimiento de los organismos (Brower *et al.*, 1990).

En el campo bioquímico de la investigación ecotoxicológica, se reconocen indicadores específicos e indicadores no específicos del estrés ocasionado por los xenobióticos. Los indicadores específicos involucran proteínas y enzimas relacionadas con procesos de detoxificación como son las metalotioneinas y el sistema mixta-oxidasa, por lo cual su cuantificación puede proporcionar una valiosa información sobre la naturaleza química del tóxico (Thomas, 1990).

Diversas respuestas a la contaminación observadas en invertebrados marinos, se evidencian a través de la síntesis de proteínas conectadas con los procesos de reparación

celular y mantenimiento de los tejidos (Bayne y Thurberg, 1988). Estos investigadores citan como ejemplo la estimulación de la degradación de la proteínas en *Mytilus edulis*, que se refleja en el daño producido por los contaminantes (hidrocarburos, metales pesados) en las membranas lisosomales de las células de la glándula digestiva. Entre este tipo de respuesta observaron también el aumento en la síntesis de metalotioneinas.

En los organismos marinos, las metalotioneinas desempeñan un papel relevante en el metabolismo de los metales. Las metalotioneinas son proteínas de bajo peso molecular que contienen hasta un 30% de cisteínas en su estructura y su síntesis es inducida cuando los organismos, tanto peces como invertebrados, son expuestos a la contaminación por metales (Addison, 1988; Viarengo y Nott, 1993).

En el crustáceo *Callinectes sapidus*, procedente de ambientes no contaminados, la composición metálica de las metalotioneinas cambia durante el ciclo de muda y cambia también la concentración de los metales. Una de las funciones propuestas para la metalotioneina de cobre, es como donadora de la forma monovalente en la síntesis de la hemocianina. Así, tanto la metalotioneina como la hemocianina se correlacionan con el proceso de muda. Esto condujo a postular la participación de tales proteínas, en el metabolismo normal de los metales, independientemente que sean inducidas por los agentes xenobióticos. En la misma dirección apunta el hecho de la razón Cu/Zn asociada, es modificada por los cambios ambientales y por la nutrición (Engel y Brower, 1987).

Los autores señalan que las metalotioneinas de cobre y de zinc, son reguladas a nivel celular por la síntesis de metaloproteínas como la hemocianina y la anhidrasa carbónica, con cobre y zinc en sus moléculas, respectivamente. Estas enzimas son indispensables en el transporte de gases y en el balance iónico, lo cual permite el funcionamiento normal y la sobrevivencia de los organismos acuáticos.

Las metalotioneinas, también están asociadas a los procesos de captación y detoxificación de los metales. Lo primero, podría explicar la sobrevivencia de organismos marinos con altos niveles de metales en sus tejidos, como es

el caso de *Patella vulgata*, que tolera grandes concentraciones de cadmio en las partes blandas de su cuerpo (Gray, 1974), referido anteriormente. Lo último, también se menciona para el cadmio y otros metales en crustáceos (Khan *et al.*, 1989; Viarengo y Nott, 1993).

Los metales divalentes como el zinc, el mercurio, el cadmio y el cobre estimulan la síntesis de las metalotioneínas, el plomo constituye la excepción. Por ello, se ha sugerido que la concentración de estas proteínas en los tejidos se puede incluir entre los índices específicos de las respuestas de los organismos marinos a la contaminación de los metales pesados (Viarengo *et al.*, 1988; Thomas, 1990; Roesijadi, 1992).

Por otra parte, en respuesta a los estresores ambientales se forman las proteínas conocidas como de "Shock" térmico (PST). Este tipo de proteínas se sintetizan cuando la temperatura del medio se eleva entre 5 y 15°C sobre la temperatura de aclimatación ó de aclimatización, en todos los organismos estudiados a la fecha, Linquist (1986); Thomas (1990); Veldhuizen-Tsoerkan *et al.* (1990, 1991) mencionan que en *Mytilus edulis* expuestos al cadmio (0.025-0.5 mg/L) por periodos cortos, se ha observado que la inducción tanto de PST como de metalotioneínas fue dosis-dependiente.

Con respecto a las proteínas que tienen acción enzimática, Addison (1988) refiere que en los peces se encuentran las enzimas de las fases I y II del sistema oxidasa de función mixta, cuando los animales son expuestos a contaminantes orgánicos como los bifenilos policlorados y los hidrocarburos aromáticos. Aunque la inducción de este sistema de detoxificación enzimático se asocia a contaminantes orgánicos, recientemente se ha encontrado que el cadmio y el mercurio también pueden inducirlo (Dalal y Battacharya, 1994).

Así, con el fin de evaluar el efecto tóxico de contaminantes y de otros estresores ambientales, se han estudiado las enzimas relacionadas con alteraciones metabólicas. En el camarón *Caridinea rajadhari*, la presencia del tributilestano interfiere con la actividad de proteasas, lipasas y amilasas en el hepatopáncreas y el cadmio disminuye la acción de la lactato-deshidrogenasa de este órgano en el cangrejo

Uca pugilator y la de la amilasa en el acócil *Procambarus clarkii* (Reddy y Fingerman, 1994).

En referencia a los plaguicidas Reddy y Rao (1989) señalan que las moléculas blanco son las enzimas colinesterasa y adenosínfosfatasa. En las larvas de la langosta *Homarus gammaurus* y de la sardina *Clupea harengus*, expuestas por 24 h a 10mg/L de un pesticida organofosforado, la actividad de la aetilcolinesterasa disminuyó significativamente con respecto a los organismos del grupo testigo (McHenery *et al.*, 1991). La medición de tales enzimas puede proporcionar un método sensible para determinar el efecto de las concentraciones subletales de plaguicidas sobre los organismos marinos (Magnotti *et al.*, 1994).

Los metales pesados afectan los procesos de osmoregulación al inhibir la acción de la Na-K-ATPasa branquial. En experimentos de corto plazo, se ha observado disminución de la actividad de la enzima en *Eriocheir sinensis*, inducida por el mercurio (Pequeux, 1995) y en *Carcinus maenas*, por el cobre (Hansen, 1992a). Cabe señalar que ni el cadmio ni el zinc afectaron la actividad de la Na-K-ATPasa branquial en *Penaeus setiferus* expuestos por 21 días a concentraciones subletales de dichos metales, aislados y en mezclas (Vanegas y Espina, no publicado).

Auffrett (1988) menciona que el cobre y derivados del petróleo producen alteraciones en los filamentos y en el epitelio ciliado branquial en *Mytilus edulis*, con el subsecuente daño en las funciones de la branquia.

Thomas (1990) destaca que entre los indicadores biológicos potenciales se encuentran todos aquellos cambios a nivel bioquímicos, inducidos por los contaminantes que tengan efectos patológicos; tal es el caso de las alteraciones en la síntesis de los lípidos o en su constitución química. La conspicua importancia de los lípidos radica en que son componentes estructurales de las membranas celulares y de otros organelos en todo ser viviente, a la vez que funcionan como reservas de energía. Los contaminantes orgánicos como los hidrocarburos del petróleo y los plaguicidas son lipofílicos en consecuencia, se acumulan en los tejidos del organismo que tienen un alto contenido de lípidos.

Se ha demostrado que la exposición de moluscos y crustáceos (*Mytilus edulis*, *Carcinus maenas* y *Homarus americanus*, entre otros) a este tipo de contaminantes interfiere el metabolismo de los lípidos provocando cambios en la síntesis de los fosfolípidos; también puede producir deficiencias de ácidos grasos esenciales y alterar la estructura de las membranas en lo referente a la fluidez. Lo que resulta más grave, es que los contaminantes lipofílicos al modificar el "pool" de los fosfolípidos alteran las respuestas adaptativas y energéticas de los organismos, a la vez que interfieren con las reservas asociadas con los procesos de reproducción y con la activación de las hormonas esteroideas durante el proceso de muda (Capuzzo y Leavitt, 1988; Reddy y Rao, 1989).

Diferentes clases de lípidos en *Mytilus edulis* y *Carcinus maenas* responden a un gradiente de compuestos orgánicos lipofílicos, los cuales producen alteraciones funcionales y estructurales en la glándula digestiva. Tales respuestas son sensibles a procesos moleculares involucrados en la captación, la retención y la pérdida de contaminantes lipofílicos (Capuzzo y Leavitt, 1988).

En el crustáceo estuarino *Metapenaeus monoceros* se ha investigado la acción de los plaguicidas; los organismos expuestos a fosfamidón, metil-paration y lindano, presentan una disminución de los lípidos totales con el subsecuente aumento de los productos de degradación. El lindano desencadena un efecto mayor que los otros plaguicidas, lo que podría indicar que este compuesto organoclorado es más específico o que penetra más rápido que los organofosforados (Reddy y Rao, 1989).

En los peces el tetracloruro de carbono, las mezclas de bifenilos policlorados, el cadmio y otros xenobióticos provocan peroxidación de los lípidos poliinsaturados, con el subsecuente deterioro de las membranas celulares y pérdida de la actividad de las enzimas unidas a estas (Thomas, 1990).

A nivel de tejidos y órganos, destaca la glándula digestiva de los bivalvos y el hepatopáncreas de los crustáceos como foco de los contaminantes, probablemente esto se deba a la acumulación de lípidos en dichas estructuras.

En *Mytilus edulis*, el cobre y la combinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y bifenilos policlorados, derivados del petróleo, producen inflamación y necrosis en los túbulos digestivos, aunque la condición histopatológica más evidente es la presencia de granulomas; dicha respuesta inflamatoria se asoció con la exposición crónica del bivalvo a los contaminantes. En altas concentraciones, los hidrocarburos y el cobre provocan la degeneración de la glándula digestiva (Auffrett, 1988).

En la misma especie se observó fragilidad de la membrana de los lisosomas de las células digestivas, lo que causa un aumento de la autofagocitosis, incremento de la fusión vacuolar con agrandamiento de los lisosomas y acumulación de lípidos y de fucsina, que es un producto de peroxidación insoluble. A su vez, esto determina la atrofia de las células y degeneración de los túbulos digestivos, lo cual se traduce en falla de las funciones digestivas y del almacenamiento de reservas, en la glándula digestiva (Moore, 1988; Viarengo *et al.*, 1988).

Además del daño celular producido por los contaminantes, ya sea directamente o a través de perturbaciones en los mecanismos subcelulares, se ha observado acumulación de calcio en las células; cabe destacar que solo los niveles de calcio libre se pueden asociar con la toxicidad celular. Las perturbaciones del metabolismo del calcio, pueden producirse en condiciones de hipercapnia hipóxica. En bivalvos sujetos a estrés hipóxico, ocurre un aumento de la presión parcial de CO_2 , lo cual provoca un aumento del calcio en la hemolinfa y en los tejidos, debido a la movilización de CaCO_3 de la concha, producido por una disminución del pH de los fluidos y de los tejidos. También se encontró que la estimulación de procesos de peroxidación inducidos por los metales pesados, causaban alteraciones en el metabolismo del calcio, lo cual fue comprobado en *Mytilus edulis*. Como no se encontraron diferencias significativas en la tasa respiratoria de los animales provenientes de diferentes sitios en un gradiente de contaminación, no se pudo atribuir el aumento del calcio observado a condiciones de estrés oxidativo. Asimismo, se demostró que la acumulación del calcio en las células provocada por la presencia del cobre, no fue alterada por el cadmio, también existente en el medio (Viarengo *et al.*, 1988).

En este mismo sentido Viarengo *et al.* (1994) se refiere a las células del epitelio branquial del mejillón *Mytilus edulis*; la exposición al cobre y al mercurio en concentraciones nanomolares y micromolares, produjeron un incremento en los niveles intracelulares del calcio dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. Los autores señalan que los metales pesados alteran la homeostasis intracelular del calcio al afectar los mecanismos de transporte a través de las membranas celulares; el incremento anormal de los niveles de calcio en el citosol, puede activar procesos catabólicos dependientes del ión tales como la hidrólisis de los lípidos, la degradación proteica y la fragmentación del DNA lo que implica deterioro y muerte celular.

Viarengo *et al.* (1988, 1994) estiman que los valores de calcio libre en el citosol, relacionados con la toxicidad, podrían constituir un indicador útil del estrés provocado por la contaminación ambiental.

Cuando se intenta asociar las condiciones deletéreas de los animales o de las comunidades, con la presencia de contaminantes, se deben tener ciertas precauciones. La mortalidad de los organismos, se podría deber a las condiciones adversas prevalecientes en el medio, como la baja concentración de oxígeno, salinidades atípicas, toxinas provenientes del florecimiento de dinoflagelados, rápidas reducciones de la temperatura y otros. En estas situaciones, la combinación de factores estresantes podrían estimular la generación de lesiones patológicas subletales. Por tal razón, se considera que los indicadores de contaminación histopatológica aunque pueden ser cuantitativos y persistentes no son adecuados si se evalúan de manera aislada (Overstreet, 1988; Hinton y Lauren, 1990).

En este sentido se debe poner atención en el hecho que la toxicidad y los mecanismos de acción de lo tóxicos dependen numerosos de factores tales como la especie, el tipo de tóxico y la interacción con diferentes factores ambientales (Fig 4).

Del Organismo al Ecosistema

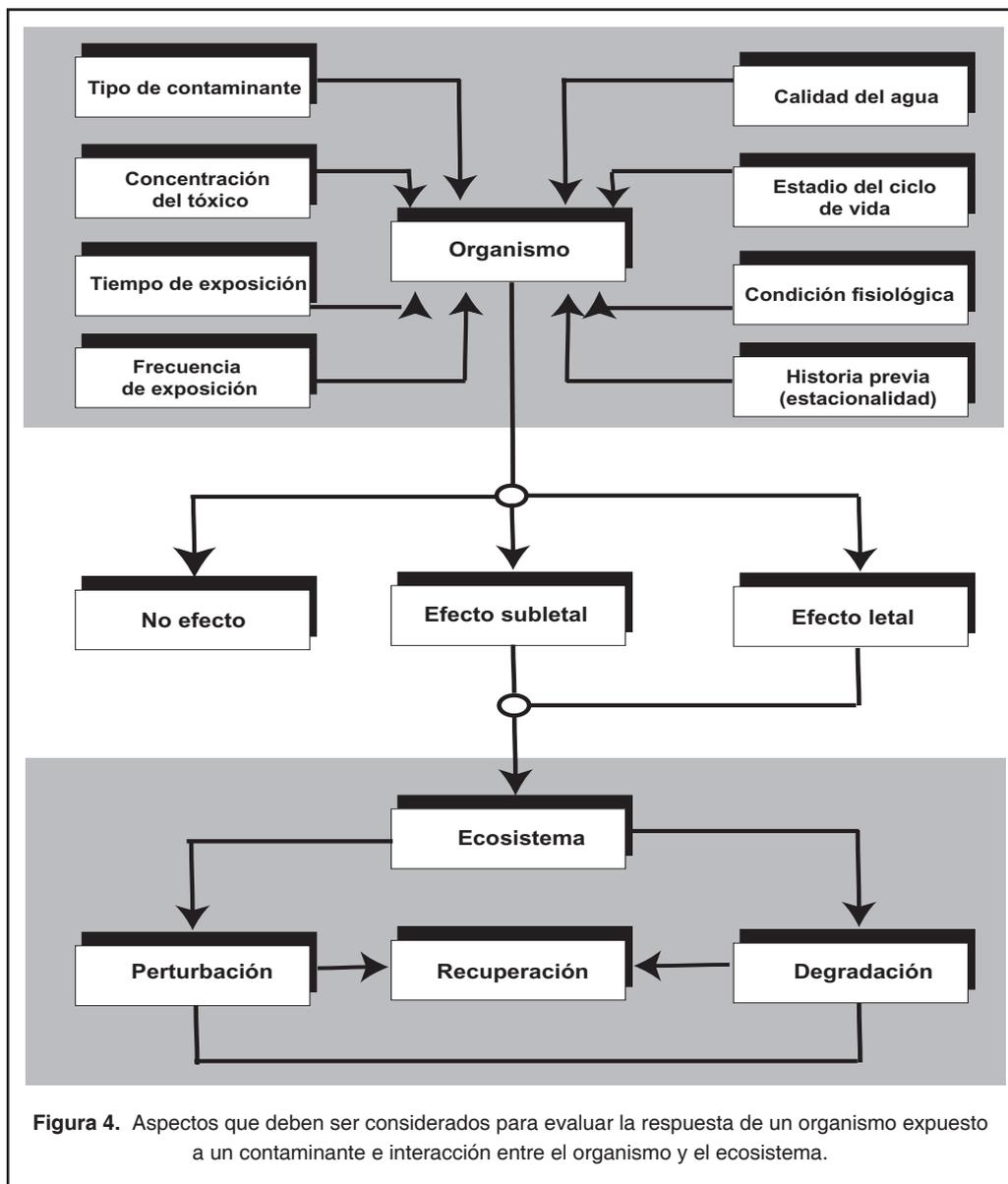
Para que una sustancia toxica tenga un efecto desfavorable, el organismo la debe incorporar.

El grado de toxicidad que se observa en el animal esta determinado por numerosos factores, tanto ambientales como inherentes a este. En los especímenes depende de la absorción, de la distribución y de la excreción, por una parte y por otra de la tasa de transformación o metabolismo del tóxico; entre las especies, la toxicidad esta determinada, por las particularidades fisiológicas de los organismo (Manahan, 1983; Koeman, 1991).

La penetración de los tóxicos en la sangre de los organismos acuáticos tienen lugar a través de la piel, las branquias y del tubo digestivo; enseguida pasan a las células de los órganos blancos por difusión simple o mediante mecanismos especiales que requieren energía. El hígado y sus homólogos y el riñón concentran dichos compuestos, en tanto que el tejido adiposo almacena principalmente los compuestos orgánicos lipofílicos y el tejido óseo los inorgánicos como el estroncio radiactivo. En el hígado se metabolizan la mayoría de estas sustancias y la excreción ocurre esencialmente en el riñón, vía orina. También pueden ser excretados vía bilis que se vierte en el intestino; otras vías de excreción son el mucus y en los animales superiores, la leche, el sudor y las lagrimas.

Las sustancias toxicas más fácilmente retenidas son las liposolubles, en tanto que las que se eliminan con mayor facilidad son las solubles en agua. Las primeras se transforman en hidrofílicas y se eliminan por la orina. Las reacciones químicas subyacentes a este proceso de transformación son mediadas por enzimas; las de la fase I incluyen reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis y sus productos experimentan reacciones de conjugación o síntesis en la fase II. Las de la fase I son catalizadas por las enzimas citocromo-P450-oxidasas que comprenden las enzimas NADPH-citocromo c-reductasa y citocromo P450 (Manahan, 1983). El conjunto se denomina sistema monooxidasa de función mixta, que como se mencionó anteriormente, se encuentra en peces.

Con respecto a los factores ambientales, los organismos no responden de igual manera ante los cambios que se producen normalmente o a los inducidos por el hombre, ni ante los compuestos xenobióticos, ni tampoco ante la combinación de ambos. Por ejemplo, en los peces expuestos al medio hipoxico, se ha ob-



servado un incremento en la captación de oxígeno hasta un cierto punto, en seguida la tasa de consumo de oxígeno decae con una consecuente reducción de la actividad aunque puede haber un aumento en otros mecanismos que permitan la adecuada provisión del gas. Esto se refiere a la utilización de las vías anaerobias. Tales mecanismos de respuesta son especie dependiente y se supone que están relacionadas con los hábitos de vida. Tanto mecanismos nerviosos como neuroendocrinos están involucrados en las respuestas que capacitan al pez para sobrevivir en esta condición adversa. El

organismo puede tolerar las severas limitaciones ambientales, sin embargo, en presencia de sustancias tóxicas, la demanda de energía aumenta en detrimento de la necesaria para el mantenimiento de otras funciones vitales (Hughes, 1981). Se conoce que la toxicidad de los compuestos xenobióticos aumenta al disminuir el oxígeno disuelto, probablemente esta es una de las causas. Los cambios de la salinidad y temperatura del medio también pueden ser estresantes y provocar una disminución de la energía requerida en el metabolismo basal de los animales.

En los estudios ecotoxicológicos, no solo es importante la iniciación y el progreso del estrés, sino también el tiempo que transcurre desde su iniciación hasta el momento de la recuperación parcial o completa del organismo, ya que ambas situaciones pueden ser representativas del estado estable fisiológico; esto adquiere relevancia cuando los estresores actúan en forma periódica e intermitente (Eddy, 1981; Schreck, 1981; 1990).

Asimismo, es fundamental considerar los aspectos ecofisiológicos de la contaminación, midiendo las respuestas fisiológicas rutinarias de los organismos ante las manifestaciones ambientales naturales, con el fin de cuantificar en que medida y de que manera los tóxicos afectan su capacidad de desempeño (Schreck, 1990).

De Kruijf (1991) refiere que la mayor parte de la información ecotoxicológica, generada hasta el momento, proviene de estudios orientados a dilucidar los procesos básicos de las respuestas fisiológicas (nivel bioquímico y molecular) y que dicha información solo en las últimas dos décadas ha trascendido al campo de la ecología.

El autor menciona que la extrapolación de los efectos de los tóxicos obtenidos en un cierto nivel hacia las jerarquías más altas de organización biológica, continua siendo un problema debido a la complejidad creciente de organismo a ecosistema.

Por otra parte en el propio sistema alterado existen mecanismos de depuración. Dichos mecanismos son operativos siempre y cuando las perturbaciones no sean continuas. El concepto de perturbación en el ecosistema implica trastornos en la estructura y en los procesos. Pratt (1990) se refiere al estrés a este nivel, como el resultado de influencias desorganiza-

doras (estresores) que provocan desviaciones del estado natural del sistema. Al respecto, indica que ante la acción de los contaminantes los procesos son menos sensibles que las estructuras.

En un determinado ecosistema, existe una inmensa red de conexiones entre los organismos y entre estos y el medio circundante. En esta red hay focos puntuales y enlaces que son más sensibles que otros a los contaminantes. Así, el estrés provocado por estos puede afectar adversamente el balance energético en las comunidades al interrumpir la producción primaria o en ciclo de los nutrientes al inhibir la actividad de especies importantes, lo que a su vez puede causar una pérdida neta de nutrientes del ecosistema (Pratt, 1990).

En los estudios centrados en el organismo, lo más conspicuo es la sobrevivencia y su contraparte, la toxicidad, que atenta contra esta. Así, no es sorprendente que gran parte de la literatura en toxicología esté orientada hacia pruebas de toxicidad.

Si se tiene información respecto los contaminantes de una región geográfica particular se podrán hacer inferencias acerca de lo que ocurriría en el ecosistema al compararlo con uno no contaminado de regiones similares (Fig. 5a). Para esto se requiere conocer las respuestas fisiológicas más comunes de los organismos ante las variables del medio incluidos los contaminantes y estudiar ciertas características básicas de la comunidad o subcomunidad y su implicación sobre el ecosistema, como pueden ser la abundancia y la diversidad (Fig. 5b).

El propósito de esta parte es presentar, de manera resumida, algunas respuestas seleccionadas de organismos expuestos a los contaminantes más relevantes en el medio marino.

METALES PESADOS

Entre los contaminantes más dañinos para la biota acuática, se encuentran los metales pesados. Aunque algunos metales son esenciales para los organismos como el cromo, cobre, hierro, molibdeno, selenio y zinc, pueden ser tóxicos si las concentraciones en el medio son

elevadas. El plomo, el cadmio y el mercurio son altamente tóxicos.

En general, los metales pesados se caracterizan por su gran afinidad con el azufre; por esta razón inactivan las enzimas ya que se unen a

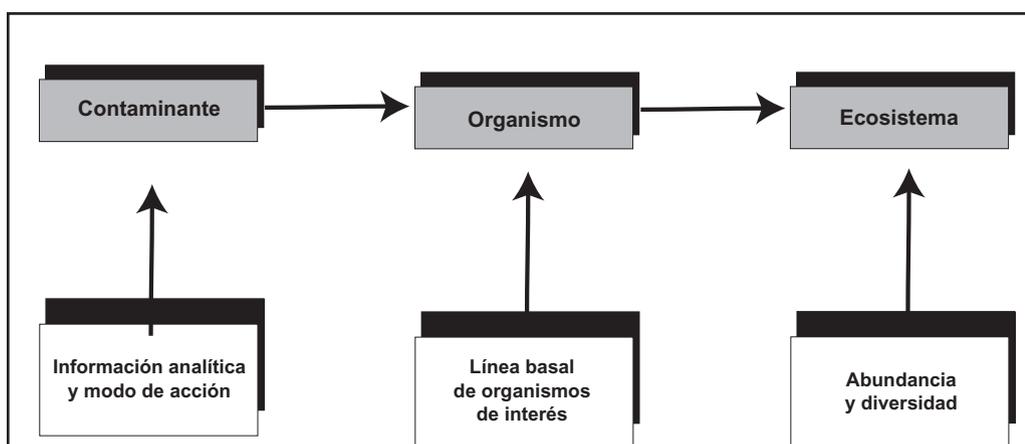


Figura 5a. Impacto del contaminante sobre el ecosistema a través del organismo e información que se requiere para evaluar dicho impacto.

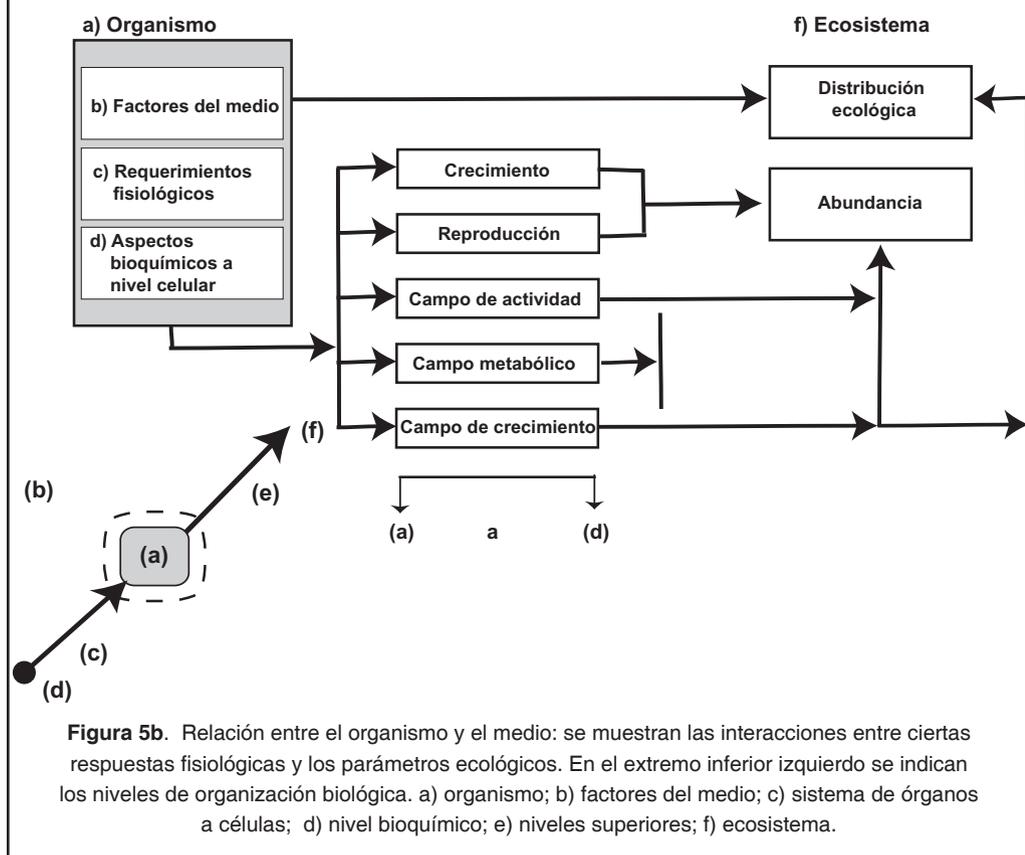


Figura 5b. Relación entre el organismo y el medio: se muestran las interacciones entre ciertas respuestas fisiológicas y los parámetros ecológicos. En el extremo inferior izquierdo se indican los niveles de organización biológica. a) organismo; b) factores del medio; c) sistema de órganos a células; d) nivel bioquímico; e) niveles superiores; f) ecosistema.

los grupos sulfidrilos (-SH), también se enlazan a los grupos carboxilos (-COOH) y aminos (-NH₂) de las proteínas. Por ejemplo el cadmio, cobre, mercurio, plata, plomo y zinc inhiben la acción de varias enzimas al formar enlaces covalentes con los radicales libres del sitio activo.

En *Fundulus heteroclitus* el mercurio se enlaza con enzimas y proteínas importantes del hígado del pez (Jackim, 1974).

Entre las enzimas cuya actividad es alterada por la exposición a los metales pesados, des-

taca la Na-K-ATPasa branquial (Hansen *et al.*, 1992a; Pequeux, 1995) así como la lactato deshidrogenasa, las lipasas, amilasas y proteasas del hepatopáncreas de los crustáceos, de la glándula digestiva de los moluscos y el hígado de los peces (Reddy y Fingerman, 1994).

Algunos metales inhiben los procesos de transporte a través de las membranas celulares al unirse a estas, como el cadmio, cobre, plomo y mercurio (Manahan, 1983).

Se ha mencionado que los peces tienen la capacidad de aclimatarse a los metales pesados, cuando se exponen a cantidades crecientes de estos contaminantes (Addison, 1988). La tolerancia de diferentes especies a los metales pesados está determinada en gran medida, por la tasa de absorción, aunque muchos factores pueden influir en la penetración de estos contaminantes.

Los factores del medio influyen notoriamente las tasas de captación y de absorción de los metales; así en los poliquetos, la tasa de captación del cobre se duplica al aumentar la temperatura en 10°C y lo mismo sucede en el camarón *Lysmata seticaudata* (Rainbow *et al.*, 1993).

La salinidad modifica la captación de los metales pesados; bajas salinidades, incrementan la biodisponibilidad y la incorporación debido a cambios en la especiación química del metal, a interacciones competitivas con otros iones por los sitios de transporte y a los efectos de los metales los mecanismos de regulación iónica y osmótica en el organismo al disminuir la salinidad (Hansen *et al.*, 1992a, b; Rainbow *et al.*, 1993). En este sentido, el conocimiento del comportamiento fisicoquímico de los tóxicos, así como las adaptaciones fisiológicas de los organismos en relación a los procesos de osmoregulación, son determinantes para evaluar tanto la incorporación y el impacto fisiológico de los metales pesados en los organismos acuáticos.

En *Nereis diversicolor*, la captación del cobre y del zinc es estimulada en medios diluidos. Asimismo, se ha observado que en *Carcinus maenas*, *Mytilus edulis* y *Littorina littorea*, la captación y la bioacumulación del cadmio es mayor en bajas salinidades (Bjerregaard y Depledge, 1994). Los autores señalan que el

cadmio se encuentra en el agua de mar principalmente como cloruro; sin embargo, al disminuir la salinidad reincrementa la concentración de la forma libre y por ende su biodisponibilidad. En contraste, el bacalao *Gadus morrhua*, absorbe el metil mercurio más rápidamente en el agua de mar que en el agua dulce.

La presencia de otros metales también influye la tasa de captación; en el caso de las ostras, la penetración del zinc, disminuye en presencia de concentraciones subletales de otros metales (Bryan, 1976).

En el cangrejo adulto *Uca pugilator*, existen importantes diferencias entre el cadmio y el mercurio. La captación del mercurio es independiente de los regímenes de salinidad a bajas temperaturas ya que se acumula en las branquias debido a una inhibición del transporte desde ésta al hepatopáncreas. En cambio, los cangrejos acumulan más cadmio en salinidades bajas que altas, independientemente de la temperatura (Vernberg *et al.*, 1974). Asimismo, el crustáceo *Corophium polutator* acumula cadmio en bajas salinidades y solo el 50% se pierde en agua limpia y en los moluscos bivalvos, *Mytilus edulis*, *Cassostrea virginica*, *Saccostrea equinata* y *Argopecten irradians*, la bioacumulación observada es mayor en la combinación de baja salinidad y alta temperatura (UNEP, 1986).

La temperatura, la salinidad y la concentración de calcio, afectan la captación del cadmio en *Carcinus maenas*, en el mejillón *Mytilus edulis*, y en el caracol *Littorina littorina* (Bjerregaard, 1990; Bjerregaard y Depledge, 1994). Zanders *et al.* (1989) reportan que el arsénico se concentra en los organismos marinos como el copépodo *Eurytemora affinis*, el cirripedio *Balanus improvisus* y el ostión, *Cassostrea virginica*.

Se han encontrado mayores concentraciones de metales pesados como cadmio, cobre, hierro, manganeso, plomo y zinc en el cefalotórax de los crustáceos *Homarus vulgaris* y *Palaemonetes pugio*, que en el abdomen y en el exoesqueleto, lo cual indica que los metales pesados se acumulan en el hepatopáncreas y en las gónadas, ya que estos órganos se encuentran localizados en la parte anterior del cuerpo (Khan *et al.*, 1989). Bjerregaard (1990)

señala que la acumulación de estos órganos se relaciona con la concentración de lípidos, proteínas y el contenido de agua en los tejidos de dichos órganos. Asimismo, se ha encontrado que los crustáceos mesopelágicos acumulan vanadio, cromo, manganeso, fierro, níquel, cobre, zinc, arsénico y cadmio (Ridout *et al.*, 1989); la escalopa japonesa *Mizuhopecten yessoensis* así como otros pectínidos, acumulan cadmio en mayores concentraciones que otros bivalvos. Los metales se encontraron principalmente en los órganos digestivos y excretorios y la concentración fue dependiente de la edad (Evtushenko *et al.*, 1990).

La tolerancia de los organismos marinos a la toxicidad de los metales pesados esta determinada tanto por la intensidad de la captación de estos contaminantes, como por la vía de absorción. Se conoce que los organismos pueden captar los metales pesados por dos vías: directamente del agua como sustancias disueltas y a través del tubo digestivo con el alimento absorbido. La primera vía es importante para los productores primarios y la última lo es para los herbívoros y los carnívoros (Sanders *et al.*, 1989). Esto no significa que los consumidores no puedan captar las sustancias disueltas del medio, ya que no son impermeables. La permeabilidad corporal esta regulada por el sistema endocrino y constituye un efectivo mecanismo, en los organismos acuáticos, que les permite ajustarse al ambiente. Se ha mencionado que la toxicidad del mercurio, por ejemplo, se relaciona con la permeabilidad corporal y que *Artemia* sp. es más tolerante que *Acartia* sp., probablemente porque la primera es la más impermeable (Bryan, 1976).

En los crustáceos la incorporación de metales pesados depende de las fases del proceso de muda. El anfípodo *Elasmopus rapax* en postmuda, incorpora cadmio más rápidamente y en mayor cantidad que durante la intermuda, a niveles incluso letales para la especie (Zanders y Rojas 1992). Es probable que este incremento en la captación del metal se deba a la alta permeabilidad corporal y al aumento en la incorporación de agua durante esta fase del proceso.

La bioacumulación de los metales pesados está también determinada por el control homeostático de los iones en el organismo. En los crustáceos, la acumulación de los metales

esenciales como el zinc, cobre y cromo aparentemente están regulados metabólicamente, en cambio, los metales no esenciales como el cadmio, y el mercurio se acumulan en los tejidos, en altas concentraciones (Bjerregaard, 1990; Rainbow y White, 1989). Esto ha sido comprobado en los anfípodos *Allochestes compressa* (Ahsamullah y Williams, 1991) y *Elasmopus rapax* (Zanders y Rojas 1992) así como en el acocil *Procambarus clarkii* (Giesy *et al.*, 1980)

Por otra parte, la tolerancia esta íntimamente relacionada con las tasas de excreción y de detoxificación de los metales pesados. Los organismos excretan ciertos metales a través de las branquias como ocurre con el zinc en *Carcinus maenas* y *Salmo gairdneri*; se ha postulado que el cobre, podría ser excretado por esta vía, ya que se ha observado un aumento en el número de células del cloro y una disminución de aquellas que secretan mucus. El fierro, puede ser excretado en forma particulada por el manto de *Crassostrea virginica* y por la glándula del biso en *Mytilus edulis*. El zinc se excreta vía orina en las langostas marinas. En *Crangon crangon* y en *Sphaeroma serratus*, existen oros mecanismos de detoxificación de los metales, como el almacenamiento del zinc de los metales pesados en forma de gránulos en las células. En *Pecten maximus*, altas concentraciones de fierro, cobre y cadmio se almacenan en el hígado y el zinc, plomo y manganeso en el riñón (Bryan, 1976).

En el camarón *Penaeus monodon* elevadas concentraciones de cobre se almacenan en granulos en el hepatopáncreas y el plomo en la glándula antenal; posteriormente son eliminados vía heces y orina respectivamente (Vogt y Quinitio, 1994). En los peces se ha encontrado que un mecanismo de detoxificación lo constituyen los corpúsculos intestinales, formados por células mucosas, mucus y gránulos; estos corpúsculos presentan una alta afinidad por el cadmio y se eliminan vía heces (UNEP, 1986).

Green *et al.* (1976) señalan que la muda, es un mecanismo de detoxificación en crustáceos, como ocurre en *Crangon crangon* con respecto al mercurio. En *Palaemonetes pugio*, se observaron mayores concentraciones de cadmio en el exoesqueleto, que de mercurio, cobre o zinc,

lo cual indica que las vías de eliminación son diferentes; en tanto el cadmio se elimina a través del proceso de muda, los otros metales se unen a las metalotioneínas de las células en los tejidos corporales (Khan *et al.*, 1989).

En lo referente a la detoxificación por bioacumulación, se ha observado gran variabilidad entre los organismos de una misma especie en diferentes regiones. Bjerregaard (1990) señala que la acumulación de los metales en los individuos de una población, en una misma localidad, ha recibido poca atención. En *Carcinus maenas*, se observaron diferencias individuales en la acumulación del cadmio, las que se relacionaron con diferencias en las condiciones fisiológicas de los cangrejos. Después de 10 h de exposición, se produjo el transporte del cadmio de la hemolinfa al hepatopáncreas.

La eficiencia de este transporte se relaciona con parámetros tales como la concentración del calcio y magnesio en el hepatopáncreas y con la concentración de proteínas en la hemolinfa. El mecanismo de dicho transporte, tiene una dinámica de saturación, lo cual se comprobó en exposiciones de 2-4 mg Cd/L en agua de mar. Cuando los especímenes se expusieron a concentraciones subletales de cadmio (0.25-1.25 mg/L) por dos semanas, se encontró un aumento dependiente de la cantidad de cadmio unido a fracciones de proteínas de alto peso molecular y en la fracción insoluble del tejido. El autor hace notar que aunque se ha hecho un gran esfuerzo por medir la concentración de los metales en diferentes órganos de animales, tanto en sitios contaminados como no contaminados, los procesos fisiológicos que conducen a la acumulación, son escasamente entendidos.

Los agentes quelantes reducen la bioacumulación de los metales en los tejidos de varios organismos. Comparativamente el cobre, en forma de cloruros, es más tóxico que el cadmio, en el camarón *Pandulus montagui*; ligeramente más tóxico en *Crangon crangon* y menos tóxico en la almeja *Malcoma balthica*. Cuando los metales se quelan con ácido etiléndiamino tetraacético (EDTA), su toxicidad cambia. El cobre quelado es menos tóxico que el cadmio en *P. montagui* y en *C. crangon*; sin embargo, el cobre es más tóxico que el cadmio en *M. balthica*. La quelación del cadmio, reduce el factor de

bioconcentración en esta especie en un 45% y en un 25% en *P. montagui*. En este trabajo se demostró que la quelación del cobre y del cadmio, reducen la toxicidad. No obstante, esta reducción no es universal entre los invertebrados marinos (McLeese y Ray, 1986).

En el concepto de toxicidad, esta implícita la muerte del organismo o las alteraciones importantes en su integridad biológica. Los contaminantes pueden modificar las funciones fisiológicas normales del organismo, reduciendo su oportunidad de sobrevivencia en el medio natural. Al respecto, es necesario tener en cuenta que la influencia de los metales pesados, varía dependiendo del metal de que se trate (Vernberg *et al.*, 1974).

A la fecha, poco se conoce acerca de las perturbaciones en los mecanismos fisiológicos que producen los contaminantes en concentraciones letales y especialmente subletales. En *Carcinus maenas* expuesto a concentraciones subletales de cobre (0.5 mg/L) se han observado el desarrollo de una acidosis metabólica. La acidosis, probablemente resultado del desbalance de cationes y aniones, es limitada inicialmente por una hipocapnia, lo cual implica un aumento en la ventilación de la branquia, ya que también se observaron niveles bajos de lactato durante el periodo de exposición. En presencia de concentraciones mayores de cobre (0.1 mg/L), el cangrejo presentó acidosis metabólica sin hipocapnia compensadora y la muerte se asoció con hipercapnia y lactoacidosis, lo que implica perturbación branquial con una concomitante alteración en el intercambio de gases. Así, el mecanismo letal se atribuye, en este caso, a la hipoxia tisular. Cabe destacar que también se observó un incremento notorio del calcio, lo que sugiere que la acidosis puede ser taponada por carbonato de calcio, movilizando del tejido óseo (Boitel y Truchot, 1989).

Thurberg *et al.*, (1973) encontraron en *C. maenas* que el cadmio eleva significativamente la presión osmótica de la hemolinfa. El cadmio, el zinc y el mercurio modifican la concentración osmótica de los isópodos marinos *Idotea neglecta* e *I. balthica* y del isópodo estuarino *Jaera albifrons* (Jones, 1975). Tales modificaciones en la función osmorreguladora se relacionan con alteraciones en la estructura del tejido branquial y en la permeabilidad.

Al respecto Pequeux (1995) señala que independientemente de si la intoxicación por metales pesados es aguda o crónica, es evidente el cambio en el potencial transepitelial de las branquias, lo que provoca severas alteraciones de las propiedades de permeabilidad y transporte del tejido, en particular en los flujos iónicos normales de sodio y cloruro. A su vez, la pérdida de la permeabilidad branquial se relaciona con la interferencia de los iones con los enlaces normales del calcio en las membranas y en las uniones intercelulares, debido a la interacción competitiva de los metales pesados por los sitios de unión del calcio.

Es consenso general que las especies estuarinas son más susceptibles que las marinas a la acción tóxica de los metales pesados. En las especies estuarinas los procesos de osmoregulación son activos debido a las variaciones de la salinidad, pero al sumarse la acción deletérea de los metales pesados con las fluctuaciones estresantes de la salinidad la toxicidad de estos se incrementa, lo que representa un serio problema.

La sensibilidad de los organismos a los contaminantes es modificada por los estadios de desarrollo y por la capacidad de adaptación de las especies. En postlarvas de *Penaeus setiferus*, expuestas a concentraciones subletales de mercurio no se detectaron alteraciones en la tasa respiratoria. Estos datos sugieren que los niveles del metal no son fisiológicamente estresantes, o bien, que los animales tienen la capacidad de adaptarse a bajas concentraciones del tóxico. Cabe hacer notar que tampoco se encontraron cambios significativos, provocados por el mercurio, en la tasa de muda ni en la tasa de crecimiento de los camarones (Green *et al.*, 1976).

En cambio, en otros crustáceos como *Artemia* sp., el cadmio es tóxico para los nauplios y las formas prenauplios son mucho más sensibles que en el estadio posterior; la presencia del metal retarda el desarrollo y la eclosión de las larvas. Los mecanismos mediante los cuales el cadmio retarda el desarrollo no se conocen, pero se postula que esto ocurre debido a una inhibición en la ruptura de la membrana, o bien que el cadmio podría bloquear directamente el desarrollo, impidiendo que la larva eclosionara (Bagshaw *et al.*, 1986).

Las larvas de *Uca pugilator*, expuestas a la acción del mercurio y del cadmio, fueron varios órdenes de magnitud más sensibles que los adultos. A concentraciones subletales para los adultos, las larvas sobrevivieron por 24 h solamente (Vernberg *et al.*, 1974). De igual manera, los ejemplares más jóvenes del camarón *Crangon crangon* fueron más sensibles al efecto tóxico del arsénico que los individuos de mayor talla (Madsen, 1992).

Para determinar el efecto tóxico de algunas sustancias sobre el organismo, se utiliza la tasa respiratoria, como el consumo de oxígeno y los movimientos ventilatorios en peces. Es necesario destacar que la tasa de ventilación ofrece dos medios para medir dicho efecto, ya que el consumo de oxígeno está relacionado con el volumen de agua que pasa por las branquias, producido por el movimiento ventilatorio y porque el tejido branquial es a menudo lesionado por los tóxicos contenidos en el agua. Además se debe tener en cuenta que el consumo de oxígeno es influido por las numerosas variables del medio como la temperatura, salinidad, la concentración de oxígeno disuelto, el fotoperíodo y por el estado reproductivo y el nivel de actividad del organismo, entre otras (Cairns y van der Schalie, 1982). En *Uca pugilator* expuesto a 1.8 ppb de Hg la tasa de consumo de oxígeno en la zoea I disminuyó, en tanto que la zoea II la tasa no cambió con respecto a los controles (Vernberg *et al.*, 1974).

Se conoce que el efecto de ciertos contaminantes es mayor cuando la concentración de oxígeno en el medio disminuye. Los animales son capaces de tolerar una reducción en el oxígeno ambiental producido por las temperaturas altas, pero si se suma el estrés producido por un tóxico, puede ser letal. En ambientes hipotóxicos, el organismo puede compensar la carencia de oxígeno, aumentando el volumen de ventilación branquial. En esta situación se incrementa la captación de oxígeno pero también se incrementa la captación de sustancias tóxicas (Cairns *et al.*, 1975; Hughes, 1976; Cairns y Garton, 1982).

Para los estudios de contaminación, la evaluación de la respuesta respiratoria es importante. En peces se ha observado que, en presencia de metales pesados, aumenta el consumo de oxígeno (Hughes, 1976).

Desde el punto de vista toxicológico, las implicaciones que tiene la alta temperatura son varias y muy complejas, e incluso puede por sí misma, ser un factor letal. La muerte del organismo, en tales circunstancias, se debe principalmente a la anoxia tisular. A temperaturas altas subletales, ocurre un aumento en la demanda metabólica (Cairns *et al.*, 1975). Por lo tanto, el efecto de cualquier tóxico que interfiera con los mecanismos de captación de oxígeno a nivel branquial y que actúe sobre las enzimas involucradas en el metabolismo oxidativo, o que aumente los requerimientos metabólicos, será potenciado por la temperatura. Al aspecto Cairns y Garton (1982) señalan que el cadmio produce bradicardia en peces, similar a la observada en ambientes hipóxicos y que el zinc reduce la capacidad de la sangre para transportar oxígeno. El cobre, el cadmio y el zinc, interfieren la captación de oxígeno a nivel branquial (Hughes, 1976).

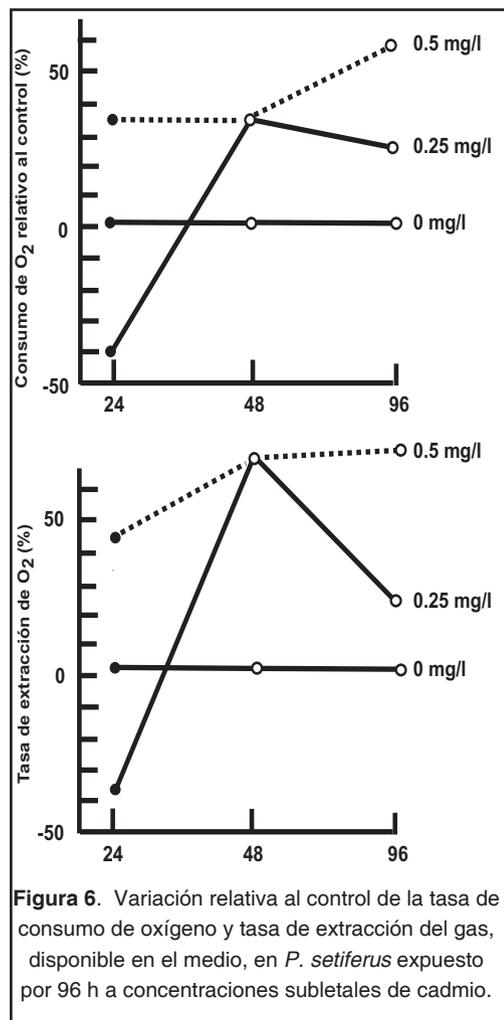
Los cangrejos adultos de *Uca pugilator* pueden tolerar altas concentraciones de mercurio y cadmio por largos periodos, siempre que la temperatura y la salinidad sean optimas; en condiciones adversas con respecto a estos factores, el tiempo de sobrevivencia de los animales expuestos a los contaminantes, se redujo significativamente. La muerte se atribuyó por una parte, a las perturbaciones que provocaron los metales pesados sobre las funciones respiratorias asociadas con la acumulación en branquias y por otra, a las alteraciones en la osmoregulación. Las respuestas fisiológicas de las larvas también reflejaron el estrés impuesto por las condiciones ambientales subóptimas y por los metales pesados en concentraciones subletales. El efecto inmediato fue la disminución de la tasa metabólica. Dicha disminución en las zoea I de *Uca pugilator* expuestas al cadmio determinó la incapacidad de capturar alimento o de escapar de los depredadores. El cadmio afectó la tasa metabólica de las larvas, en condiciones óptimas de temperatura y salinidad, en mayor grado que el mercurio, aunque este fue más tóxico a mayores concentraciones (Vernberg *et al.*, 1974).

La disminución en el consumo de oxígeno también ha sido reportado para *Crangon crangon* por efecto del arsénico (Madsen, 1992) y para *Procambarus clarkii* por efecto del plomo (Torreblanca *et al.*, 1987).

En ejemplares juveniles de *Penaeus aztecus* y *Penaeus setiferus* de la laguna de Tamiahua, Veracruz, se midió la concentración letal media (CL₅₀-96 h) del cadmio (Espina, Vanegas, y Botello, no publicado). Los resultados indicaron que los juveniles de *P. aztecus* fueron más sensibles que los de *P. setiferus* ya que las CL₅₀ obtenidas fueron 1.32 y de 3.04 mg Cd/L respectivamente.

Ambas especies se aclimataron a la temperatura y a la salinidad correspondientes a punto isosmótico de los juveniles. En concentraciones subletales de 0.25 y 0.50 mg Cd/L, el cadmio afectó significativamente la tasa respiratoria de *P. setiferus*, evaluada a través del consumo de oxígeno y la tasa de extracción del gas, del disponible en el medio, después de 24 h de exposición (Fig. 6). El comportamiento de ambas tasas fue similar en la menor en la menor concentración donde se produjo una inhibición importante (40%). En cambio, en la concentración mayor, mientras que el consumo de oxígeno aumento en un 34%, la tasa de extracción solo se incrementó en un 25%. Se comprobó que el cadmio, en concentraciones subletales, afecta la tasa respiratoria de los camarones estuariños, al igual que en otros crustáceos (Thurberg *et al.*, 1973; Gaudy *et al.*, 1991, Zanders y Rojas, 1992), lo cual se atribuye a la inhibición enzimática (Green, 1976). Por otra parte, cuando los camarones se expusieron a 0.5 mg Cd/L la tasa metabólica aumentó, como ocurre en especies tolerantes (Calow y Sibly, 1990). Este incremento puede ser reflejo tanto del aumento locomotor, como de la actividad de las bombas ventilatorias (Hughes, 1976). En dicha concentración, la tasa de extracción no se elevó de manera similar a la del consumo de oxígeno, por lo cual se puede inferir que el cadmio produjo perturbaciones a otros niveles.

Repuestas similares se observaron en juveniles de *P. setiferus* de la laguna de Términos, Campeche, expuestos a concentraciones subletales de cadmio (Castro, 1995) y de zinc (Vanegas y Espina, no publicado) en los que además se observaron cambios en la razón atómica O/N. Los valores de la razón indicaron una mayor utilización de lípidos y proteínas, como substrato metabólico, en los camarones expuestos a las mayores concentraciones de los metales que en los grupos testigo.



En el místico *Lypomisis lingvura* expuesto a concentraciones subletales menores a 0.1 mg Cd/L, se observó una disminución en la tasa de consumo de oxígeno. En otras especies de invertebrados, se ha observado que el cadmio puede inhibir, aumentar o no producir cambios notorios en la respuesta respiratoria. Al parecer, la intoxicación con cadmio presenta dos fases, la primera se caracteriza por el incremento de la demanda de ATP a lo cual el organismo responde aumentando la fosforilación oxidativa; esto se asocia con una respuesta de tipo adaptativo ante la contaminación. La segunda fase es de intoxicación severa, en ella el organismo ya no puede responder a la demanda energética y el consumo de oxígeno baja, lo cual le causa la muerte. De hecho, los cambios en la tasa respiratoria se pueden relacionar directamente con una inhibición enzimática.

Paralelamente se comprobó que el cadmio inhibía la actividad de las hidrolasas de la segunda fase. En consecuencia, la capacidad de asimilación disminuye, lo cual se manifiesta en la reducida cantidad de heces que producen los organismos. Así, por una parte el animal requiere energía y por otra, no puede obtenerla de su fuente, el alimento. El cadmio, aun en niveles subletales afecta varias respuestas fisiológicas, a nivel respiratorio, nutricional y excretor, todas ellas dependientes de la temperatura (Gaudy *et al.*, 1991).

Calow y Sibly (1990) destacan la considerable importancia ecológica del campo de actividad metabólico, ya que influye sobre la distribución, el crecimiento y la reproducción de los organismos, por lo tanto, determina su abundancia en los ecosistemas.

La temperatura influye en el campo de actividad como la diferencia entre el metabolismo estándar (basal) y el activo. Los límites de actividad máxima se sitúan dentro de la zona de tolerancia al factor de una especie en particular el campo de actividad puede disminuir en presencia de los metales pesados, al aumentar los requerimientos metabólicos. En presencia de los contaminantes las especies tolerantes, aumentan su tasa metabólica, es decir, despliegan sus respuestas de resistencia. En dichas especies el campo de crecimiento disminuye, pero sus oportunidades de sobrevivencia aumentan puede ser lo que constituye una ventaja, siempre y cuando la reducción no sea importante (Calow y Sibly, 1990).

Cabe destacar que el aumento del consumo de oxígeno, puede ser reflejo de la actividad locomotora asociada con la respuesta de escape del animal a las condiciones adversas, aunque también se puede atribuir al aumento de la actividad de las bombas ventilatorias. En referencia a la temperatura, es posible mencionar que al aumentar esta, los mecanismos de detoxificación y los procesos excretorios de los organismos también aumentan, lo cual cancelaría el efecto de la temperatura (Hughes, 1976).

Los metales pesados, a niveles subletales, pueden alterar los procesos de alimentación, la actividad natatoria y el aprendizaje de los peces; el zinc y el cobre inhiben el crecimiento de peces y crustáceos y de prácticamente

todos los organismos marinos; el mercurio y el cobre inhiben el asentamiento de las larvas, en concentraciones subletales (Bryan, 1976). El cobre a bajas concentraciones altera la tasa de filtración de *Mytilus californianus*, lo cual se ha atribuido a la acción del metal sobre neurotransmisores del ganglio visceral, íntimamente relacionados con la actividad ciliar de las branquias; esta respuesta puede representar un índice de toxicidad temprana (Smith, 1985). Alteraciones similares en la tasa de filtración por efecto del cadmio, el cobre y el zinc han ido observadas en *Crassostrea gigas* (Lin *et al.*, 1992).

Los quimiorreceptores de los peces intervienen en diversos y numerosos procesos como son el apareamiento, las migraciones reproductivas, la formación de cardúmenes, el reconocimiento de predadores y la alimentación. Un estudio sobre el efecto de la toxicidad aguda del mercurio, cobre y zinc sobre la olfacción de *Coho salmon*, reveló que el cobre y el mercurio inhiben el comportamiento de evitación a la serina; en cambio el zinc, no tuvo efecto visible sobre la olfacción. La L-serina como otros aminoácidos, son componentes de una gama de olores naturales; en los peces, son potentes odoríficos (Rehnberg y Schreck, 1986).

Las pinturas que se emplean para evitar organismos incrustantes en los casos de los barcos y otro medios de transporte marítimo contienen estaño; el metal se libera paulatinamente

al medio marino y forma compuestos orgánicos como los tri, di y monoalquinos. Hawkins y Hutchinson (1990) demostraron que dichos compuestos afectan directamente las poblaciones de gasterópodos *Nucella lapidus* y *Ocenebra erinacea*, debido a que en presencia de los contaminantes las hembras se transforman en machos con la subsecuente esterilidad. También el tributill estaño es tóxico para *Scrobicularia plana* en concentraciones que exceden 0.3 mg Sn/g de sedimentos, aunque la respuesta más sensible descubierta hasta ahora es la inhibición de la reproducción en gasterópodos del suborden Stenoglossa, *N. lapidus*. El síndrome conocido como imposición de sexo -"imposex"- es inducido por concentraciones menores de 1 mg Sn/L y su intensidad es dependiente de la concentración. La frecuencia del imposex en *Nucella*, se considera un excelente índice de bajos niveles de tributill estaño en el ambiente, a la vez que la esterilidad puede ser usada para determinar el impacto sobre la estructura de la población (Langton *et al.*, 1990; Spence *et al.*, 1990).

En el trabajo del grupo de expertos de las Naciones Unidas (GESAMP, 1985) se señala que 1 mg Sn/L de compuestos orgánicos del estaño, son deletéreos para los organismos marinos. En mayor concentración es dañina para los estadios tempranos de varias especies, particularmente para crustáceos y moluscos.

LODOS DE PERFORACIÓN

El impacto sobre la biota marina de la combinación de contaminantes contenidos en el petróleo y en los lodos de perforación como metales pesados e hidrocarburos, se ha medido de diversas maneras: en experimentos controlados de laboratorio y en mesocosmos; en gradientes en el campo parcialmente controlados y a distancias variables de los sitios donde se lleva a cabo las operaciones de extracción petrolera.

Al respecto, el panorama general es confuso y no resulta fácil extrapolar los resultados de los ensayos o de las mediciones hechas en experimentos controlados en situaciones globales a nivel de ecosistema. Por ejemplo, aunque los organismos pueden acumular metales pe-

sados e hidrocarburos derivados del petróleo, no se han encontrado diferencias significativas entre varias especies de diversos grupos biológicos (crustáceos decapados, estomatópodos y equinodermos), colectados en sitios cercanos a los sitios de perforación, antes y después de haberse llevado a cabo las operaciones pertinentes (Gettleston, 1980).

Este autor cita que el fitano y las n-parafinas encontradas en *Penaeus aztecus*, recolectados después de operaciones petroleras hechas en el Golfo de México, sugieren fuertemente que eran originarias del petróleo. Sin embargo, mencionan que como los análisis fueron posteriores a las perforaciones, no se puede afirmar

que esto se deba a las actividades realizadas. También indica que los peces demersales estaban en buenas condiciones antes y después de dichas operaciones y que en los corales no se observaron efectos positivos ni negativos, en cuanto a mortalidad, estrés o crecimiento.

Gettleston (1980) menciona también que en el Golfo de México se ha perforado un área que abarca 62,800 km², lo cual comprende el 20% de la plataforma continental de USA en la zona; un pozo típico descarga entre 250 a 100 toneladas de lodos en una operación completa, en tanto que el río Mississippi descarga un millón de toneladas por día en promedio. De lo anterior, el autor infiere que los efectos potencialmente deletéreos solo se concretarían si se combinaran las descargas de varios pozos, lo que no ocurre puesto que esta regulado por ley. También opina que si las descargas tuvieran efectos subletales acumulativos estos podrían ser deletéreos, pero no hay evidencias que confirmen tal suposición. Además menciona que los bioensayos de laboratorio en los cuales se ha comprobado el efecto tóxico de los lodos de perforación, no son realistas en cuanto a apreciar la toxicidad de sus componentes en el campo; señala también que en dichos estudios se ha demostrado que la barita y la bentonita no son tóxicos y que en los estudios llevados a cabo en el campo no se han detectado variaciones ni en la distribución, ni en la abundancia de los organismos en los sitios aledaños al lugar donde se efectúan las perforaciones.

Otros investigadores refieren que las descargas de los lodos de perforación no dañan los organismos y por el contrario, las acumulaciones de petróleo en el fondo marino y las pilas de rocas que se desprenden podrían tener un efecto benéfico; la inocuidad de los compo-

nentes se debería a que los lodos serían rápidamente dispersados y diluidos en el mar (Monaghan *et al.*, 1980).

En contraste, en un estudio realizado sobre siete especies de corales escleractinios de los géneros *Acropora*, *Montastrea*, *Potire*, *Dichocoenia* y *Agaricia*, expuestas a 100, 316 y 1000 ml/L de lodos de perforación, se menciona que en las dos primeras concentraciones murieron *Agaricia* y *Montastrea*, a las 75 h de exposición y *Acropora* a las 65 h y en la última concentración, murieron todos los pólipos (Thompson *et al.*, 1980).

En el cangrejo amarillo *Cancer anthony* se investigó la acción de once metales pesados contenidos en los lodos de perforación (Mcdonald *et al.*, 1988). Los resultados de este trabajo indican que el cloruro férrico retarda la eclosión de los embriones del cangrejo. El cadmio, cromo, mercurio, cobre y zinc fueron altamente tóxicos para los embriones de la especie, al igual para los de *Cancer magister*. En este estudio se encontró que el cromo IV fue el más tóxico para *C. anthony* que para *C. magister* y que el cobre retardó la eclosión de *C. anthony* en concentraciones 100 veces más bajas que aquellas que provocaron mortalidad. El manganeso interfirió la eclosión de este metal así como el fierro afectaron la sobrevivencia de los embriones. En dicha investigación las pruebas para la determinación de la CL₅₀ de los embriones, se tardaron más de 96 h (Mcdonald *et al.*, 1988).

El contraste de los resultados obtenidos en los trabajos antes referidos, crea dudas sobre la posibilidad de llegar a conclusiones globales que sirvan de base para normar las actividades del hombre en este campo.

HIDROCARBUROS DERIVADOS DEL PETRÓLEO

El petróleo tanto en su forma cruda como refinada es uno de los xenobióticos potencialmente tóxicos para la biota acuática; ocasiona severas alteraciones metabólicas en los organismos y repercute en última instancia, en cambios estructurales y funcionales en los ecosistemas marinos (Davison *et al.*, 1992).

El efecto del petróleo sobre los organismos o estuarinos, se debe principalmente a los hidrocarburos presentes en la fase acuosa, ya sea en solución o en dispersión. Independientemente del tipo de petróleo, la mortalidad de los organismos ocurre en las primeras 24 h. En estudios de laboratorio se encontró que la fracción

soluble en agua (FSA) del petróleo proveniente del derrame del pozo Ixtoc I en el Golfo de México, fue letal para *Penaeus aztecus* cuando los camarones juveniles se expusieron por 24 h a las concentraciones de 43% FSA y la CL_{50} - 24 h se obtuvo en 25% FSA. Dicha prueba de toxicidad se efectuó en condiciones de 30 °C y 23‰ de salinidad, consideradas óptimas para los especímenes provenientes de la laguna de Tamiahua, Veracruz (Barrera, 1982; Barrera y Espina, 1984).

A su vez, Wang y Stickle (1987) señalan la alta tolerancia de los juveniles de *Callinectes similis* a la FSA del petróleo crudo South Louisiana; la CL_{50} obtenida en 21 días de exposición fue de 4501 ppb.

El naftaleno, e uno de los componentes mas tóxicos del petróleo; en anfípodos *Gammarus mucronatus* y *Amphithoe valida*, concentraciones menores de 0.8 ppm son letales y el dimetilftaleno, es más tóxico que el compuesto aislado; lo mismo ocurre con el benceno sustituido. También se postula un efecto sinérgico entre los componentes aromáticos del petróleo (Lee y Nicol, 1978).

Tanto moluscos como crustáceos y peces pueden acumular hidrocarburos derivados del petróleo en los tejidos. Las evidencias sugieren que los hidrocarburos aromáticos se acumulan rápidamente y en concentraciones mayores que los alcanos. A la vez que se retienen por periodos mas largos en los tejidos del animal. Los moluscos captan los hidrocarburos del petróleo más lentamente que los crustáceos, pero los acumulan en altas concentraciones y los liberan más lentamente (Anderson *et al.*, 1974).

En los bivalvos, los hidrocarburos de petróleo se acumulan rápidamente en la glándula digestiva; a nivel branquial también se registra una acumulación considerable (Axial *et al.*, 1988). Dicha glándula es un órgano rico en lípidos y al igual que el hepatopáncreas en crustáceos y el hígado en peces, es el principal sitio de acumulación y excreción de materiales solubles en lípidos, como los hidrocarburos y los plaguicidas (Axial *et al.*, 1988; Reddy y Rao, 1989; Lemaire *et al.*, 1992 y Jobling, 1994).

En crustáceos, el ciclo de muda también determina el grado de acumulación de los hidro-

carburos derivados del petróleo. En adultos de la jaiba *Callinectes similis* del medio natural, los hidrocarburos policíclicos aromáticos se acumularon en mayor proporción en organismos recién mudados (estadio A) que en aquellos en estado de intermisa (estadio C). Estas diferencias se pueden deber al aumento de la permeabilidad del exoesqueleto, al incremento de la captación de agua durante la fase de postmuda o a la inhibición de los mecanismos de detoxificación (Mothershead y Hale, 1992).

El benceno es el hidrocarburo aromático más abundante del petróleo crudo, ya que comprende aproximadamente el 20% de su composición; es relativamente soluble en agua y se encuentra entre los más tóxicos. Entre 5 y 50 ppm, el benceno induce un considerable estrés fisiológico en los huevos y larvas de la sardina *Clupea payáis* y de la anchoa *Engraulis mordax*. A bajas concentraciones, se observa un notorio aumento en la tasa de consumo de oxígeno en las larvas, con subsecuente costo metabólico debido al estrés. A concentraciones mayores, la tasa metabólica disminuye, lo cual se atribuye al efecto del benceno como narcótico; las exposiciones de los huevos al benceno induce anomalías en los embriones (Struhsaker y Eldridge, 1974).

Los estudios sobre las poblaciones de camarones peneidos de la sonda de Campeche, indican que los hidrocarburos provenientes del petróleo, no producen efectos detectables que se puedan adjudicar a las actividades petroleras desarrolladas en esta área del Golfo de México; las concentraciones de hidrocarburos registradas en los tejidos de *Penaeus aztecus*, *P. setiferus* y *P. duorarum*, no se consideraron críticas (Botello *et al.*, 1992). Anteriormente se había demostrado que la ingestión de una dieta contaminada con petróleo crudo (3 mg/g peso húmedo del alimento) no alteraba el crecimiento de los camarones (Botello, 1975).

En organismos juveniles de *Penaeus aztecus* de la laguna de Tamiahua, Veracruz, expuestas a la fracción soluble en agua (FSA) del petróleo crudo en Ixtoc I, se midió la concentración osmótica de la hemolinfa de ejemplares aclimatados a 30°C y 23‰ a la salinidad del punto isosmótico de la especie, a esa temperatura. Las concentraciones utilizadas fueron 19.2, 24.2 y 30.5% FSA esta disminuyó signifi-

cativamente (14%). La CL_{50} -24h de los camarones se calculo en 25% (Barrera, 1982; Barrera y Espina, 1984).

En el caso de *P. aztecus* se ha reportado que tiene la capacidad de regular la presión osmótica de su medio interno, tanto a bajas como a altas salinidades, en temperaturas de 20 y 30°C (Espina *et al.*, 1976; Sánchez, 1979). La respuesta osmorreguladora se relaciona con una disminución de la permeabilidad; en el punto isosmótico se ha encontrado la mayor reducción de varios crustáceos. Se postula que la disminución de la permeabilidad concuerda con una osmoregulación activa (Roesijadi *et al.*, 1976a). Tomando en cuenta lo anterior, se podría atribuir la respuesta observada en la mayor concentración 30.5% FSA al deterioro fisiológico de los animales ya que en dicha concentración se produjo la muerte del 75% de la muestra, mientras que en 19.2% FSA solo murió el 15% de los organismos. En estas condiciones, los sobrevivientes estarían aún en condiciones de mantener los mecanismos de regulación, los cuales dejarían de ser efectivos cuando los camarones se exponen 24% FSA. Obviamente, es necesario conocer la concentración de los hidrocarburos en los tejidos de los especímenes para poder comprobar esta hipótesis (Widdows y Donkin, 1991).

Morales-Loo y Goutx (1990) comprobaron que la FSA del petróleo mexicano "Istmo Cactus" perturba el crecimiento de algas en cultivo, lo cual se asocia con alteraciones en los mecanismos fotosintéticos de las baciliarofitas, crisófitas y clorofitas; algunas baciliarofitas, cianofitas, fueron menos sensibles.

Considerando que la tasa metabólica es una medida global de la condición funcional de un animal, se ha elegido para estudiar el efecto de mezclas de petróleos y agua, a concentraciones subletales, en animales estuarinos. En el pez *Cyprinodon variegatus*, Anderson *et al.* (1974) midieron la tasa respiratoria de ejemplares expuestos a 4 tipos de petróleo; observaron que tanto la dirección del cambio (aumento o disminución) como la magnitud del mismo, dependía de la concentración. En los crustáceos *Penaeus* y *Palaemonetes*, la tasa respiratoria disminuyó ligeramente, durante o inmediatamente después de la exposición. Sorpresivamente, la magnitud del cambio en la

tasa fue mayor en las concentraciones menores (Anderson *et al.*, 1974).

Por otra parte, Lauglin y Neff (1980) observaron que el consumo de oxígeno se incrementaba en larvas y juveniles de *Rhithropanopeus harrissi*, expuestos al fenantreno.

El efecto de los hidrocarburos de petróleo sobre el metabolismo aerobio de los organismos, depende del efecto combinado de numerosos factores, tanto abióticos como bióticos, entre los que destacan la temperatura, la salinidad y la composición de los hidrocarburos, así como la tolerancia de las especies.

En el pez antártico *Pagothenia brochgrevinki* expuesto a 50 y 100% de la fracción soluble del petróleo en agua (FSA) no se observó mortalidad, pero la tasa metabólica se incrementó de 80 a 120% y en un 50 % el hematocrito en sangre (Davison *et al.*, 1992). Los autores señalan que en los peces expuestos por plazos cortos a la FSA, se observó alteración en el balance de los electrolitos, lo cual lo atribuyen a modificaciones en la concentración de catecolaminas y corticoesteroides en el plasma; en exposiciones crónicas, la perturbación hidromineral fue consecuencia del deterioro morfológico y funcional de las branquias.

La fracción soluble en agua del petróleo crudo, produce cambios en la respiración y el crecimiento de *Crangon crangon* a 10, 15 y 20°C. las exposiciones agudas redujeron la tasa de consumo de oxígeno entre 10 y 15°C, aumento en los 20°C, y el crecimiento se redujo en relación a la concentración de FSA. La exposición crónica, provocó una disminución en ambas tasas a medida que aumentó la concentración. La mortalidad se incrementó debido a la presencia de FSA y fue mayor a concentraciones mas altas (Edwards, 1978).

En *Mytilus edulis* se ha investigado el efecto del FSA del petróleo Esso Extra 2; los ejemplares presentaron inhibición significativa en la tasa de consumo de oxígeno (Dunning y Major, 1974). Este estudio se realizó en animales intactos y con el músculo aductor seccionado, de manera tal que fue posible distinguir las causas de la disminución de la captación de oxígeno. Por una parte los resultados se atribuyeron al cierre de las valvas y por otra, a la activi-

dad reducida de los cilios de las branquias. Se sugiere que los derivados del petróleo tienen una acción anestésica sobre la actividad ciliar. Tampoco se descarta la posibilidad que la secreción de mucus interfiera con la captación de oxígeno; además el petróleo inhibió la secreción de hilos bisales. Si se considera que *Mytilus edulis* vive expuesto a la acción de las olas, en la zona intermareal, se comprenderán las implicaciones del hecho que los contaminantes interfieran con la capacidad del animal de adherirse a las rocas. El cierre de las valvas de los animales intactos, disminuye con el tiempo de exposición a la influencia del petróleo y por tanto, serán presa fácil de los depredadores.

Asimismo, en un experimento diseñado para medir el efecto a largo plazo de la fracción soluble en agua (FSA) del petróleo crudo sobre el isópodo marino *Sphaeroma quadridentatus* en estadio juvenil, los ejemplares se expusieron a concentraciones de FSA desde 0.1 hasta 15% a 24°C. Los especímenes crecieron y se reprodujeron, pero en la concentración de 1% de FSA, la fecundidad disminuyó y la tasa de crecimiento fue afectada adversamente en niveles menores de 3% FSA. Cuando los organismos se trasladaron a agua limpia, a las cinco semanas habían muerto el 75% de los animales expuestos al 1% de FSA (Lee, 1978). Por tanto se puede concluir que una población de *Sphaeroma* expuesta a concentraciones tan bajas como 0.2 ppm, podría desaparecer, aun que los individuos llegaran a la madurez.

En condiciones naturales el aumento de la mortalidad y la reducción del crecimiento de organismos expuestos al petróleo (FSA), puede producir una disminución en la biomasa de la población, lo cual repercutiría en la reducción del flujo de energía hacia otros niveles de organización biológica (Edwards, 1978).

Los estudios sobre bioenergética integran las funciones fisiológicas básicas de los organismos, en el campo de crecimiento (CDC), por lo que se considera como el enfoque más adecuado para evaluar los efectos subletales de los xenobióticos en los organismos marinos. Así, el CDC se ha empleado exitosamente

como indicador del estrés causado por los hidrocarburos tanto en estudios de laboratorio como en poblaciones naturales (Wang y Stickle, 1987; Widdows *et al.*, 1990; Viarengo y Canesi, 1991).

En *Venus verrucosa* se ha demostrado que la presencia de hidrocarburos del petróleo, afecta negativamente el CDC del animal debido a que disminuye la tasa de alimentación. Los hidrocarburos del petróleo alteran la actividad de los cilios de las branquias del bivalvo, los cuales pierden la capacidad para retener partículas menores de 6 mm y aumenta la producción de mucus. Todas estas perturbaciones dan cuenta de la inhibición observada en la tasa de alimentación del molusco (Axial y George, 1987).

Resultados similares han sido reportados en crustáceos. En los juveniles de *Callinectes similis* expuestos a concentraciones subletales de FSA de petróleo (820, 1476 y 2504 ppb) se observó una reducción significativa en el campo de crecimiento dosis-dependiente. Asimismo, se observó una disminución en la biomasa y extensión del periodo de intermuda, relacionados directamente con la concentración de hidrocarburos. La reducción del campo de crecimiento se debió fundamentalmente a la alteración en las tasas de ingestión y de asimilación del alimento. Tal reducción en el consumo del alimento puede ser atribuido al efecto narcótico de los compuestos (Wang y Stickle, 1987)

En investigaciones realizadas en ecosistemas experimentales donde se midió el efecto crónico de bajos niveles de petróleo disperso en agua, sobre la macrofauna y la meiofauna, se encontró que la contaminación simulada produjo una disminución de la diversidad en los grupos testigo, altamente significativa (Grassle, 1989). En cambio en el medio natural, un importante derrame de petróleo no afectó la estructura de las comunidades de peces (Yáñez-Arancibia, 1986). El autor se refiere al derrame de un pozo petrolero (Ixtoc I) en la plataforma continental frente a Campeche, en el Golfo de México; los estudios se llevaron a cabo en la sonda de Campeche como en la laguna de Términos.

MEZCLAS DE PETRÓLEO Y OTROS CONTAMINANTES

Como se señaló previamente, una respuesta integradora de la relación organismo-medio, es sin duda la medición de la energía potencial de crecimiento (CDC) basada en el análisis fisiológico del balance de energía del organismo. Entre los factores del medio se consideran todas las variables ambientales, incluidos los tóxicos.

Al respecto, Widdows y Johnson (1988), utilizaron en *Mytilus edulis* los procedimientos de la energética fisiológica para cuantificar el efecto de los metales y del petróleo sobre los organismos. Evaluaron el funcionamiento de los animales a través del campo de crecimiento y de la eficiencia de crecimiento, en ejemplares expuestos a un gradiente de contaminación en el campo y en el mesocosmos. Los resultados evidenciaron el efecto deletéreo del cobre y del petróleo diesel por la disminución del CDC, dependiente de las concentraciones. Encontraron también una clara correlación entre la disminución del CDC y la concentración de hidrocarburos aromáticos en los tejidos del organismo; una correlación similar se observó con el cobre. La disminución en la energía potencial de crecimiento se atribuyó a la acción de los hidrocarburos, especialmente de los aromáticos, sobre la tasa de filtración del bivalvo "en un intervalo de concentraciones que representan mas de tres ordenes de magnitud, sin umbral". El cobre, en cambio, ejerció efectos sobre las tasas de alimentación y crecimiento en intervalos más estrechos, con un efecto umbral entre 5 y 10 mg Cu/L y una marcada inhibición en 20 mg Cu/L.

Widdows *et al.* (1990) midieron también el campo de crecimiento en el mejillón *Arca zebra* expuesto a un gradiente de contaminación en medio natural; evaluaron los contaminantes potencialmente tóxicos, como metales traza, al-

quietaño, bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos y alifáticos del petróleo y sus derivados. Estos contaminantes se encontraron en los tejidos del mejillón y se correlacionaron con una disminución en el campo de crecimiento, atribuible a una disminución en la tasa de alimentación. El compuesto de estaño produjo un aumento en la tasa de consumo de oxígeno, con perturbaciones a nivel de la fosforilación oxidativa. Los hidrocarburos y sus derivados provocaron una disminución del 50%. En la tasa de filtración. El campo de crecimiento no solo proporciona una manera de identificar las clases de contaminantes tóxicos en el medio que producen reducción en esta tasa, sino también es indicativo del modo de acción de estos. Así, la interpretación ecotóxica de los datos de los residuos de los contaminantes en los tejidos de *Arca zebra*, indicaron que los derivados del petróleo y el alquietaño, contribuyen principalmente a la reducción de la energía potencial de crecimiento, con valores de 65-79% y de 21-35% respectivamente.

También se intentó medir el campo de crecimiento de el caracol *Littorina littorea*; sin embargo debido a las serias dificultades para determinar algunas de las respuestas fisiológicas necesarias para calcular el campo de crecimiento del animal, no se recomienda esta especie para el monitoreo de contaminantes (Bakke, 1988; Capuzzo, 1988). Como el caracol presenta una actividad de forrajeo fluctuante, es difícil de evaluar la tasa de ingestión. Además, Bakke (1988) indica que para *L. littorea* es necesario conocer los factores externos e internos que regulan los procesos básicos de la conversión de energía y la eficiencia de absorción del caracol, antes de intentar medir el campo de crecimiento en el medio natural

PLAGUICIDAS

El incremento del aporte de numerosos plaguicidas en los ecosistemas acuáticos, producto de su amplia utilización en las prácticas agrícolas e industriales, ha despertado gran preocupación debido a la alta toxicidad que

ejercen en la biota acuática, a la elevada bioacumulación y a su persistencia en el medio.

La toxicidad de los plaguicidas es especie-dependiente y también esta influida por el estadio

de desarrollo de los especímenes así como por los factores ambientales, principalmente por la temperatura y la salinidad.

En lo referente a los estadios de desarrollo, se ha mencionado que los juveniles del cangrejo *Chasmagnathus granulata* fueron más sensibles que los adultos a un insecticida (etil-paration) y a un herbicida que contiene un éster del ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D); ambos se utilizan regularmente en cultivos agrícolas (Rodríguez *et al.*, 1992.)

Por otra parte al exponer los cangrejos *C. granulata* y *Uca uruguayensis* a estos plaguicidas por 96 h, se observó que el paration fue mucho más tóxico que el herbicida, lo cual también ocurrió en la exposición crónica (4 semanas); sin embargo, la toxicidad del paration fue mayor en los adultos que en los juveniles y *C. granulata* fue más sensible que *U. uruguayensis* (Rodríguez *et al.*, 1992.). Los autores explican que ante la toxicidad aguda del pesticida, los adultos son más tolerantes porque sus reservas de lípidos son mayores que la de los juveniles y que en exposiciones prolongadas, tal mecanismo de detoxificación ya no es eficiente.

Los cangrejos expuestos a los plaguicidas, como *Cancer magister* y *Hemigrapsus nudus* son menos resistentes que los controles en baja salinidad, lo cual se atribuye a una reducción en la capacidad osmorreguladora de estos organismos (Caldwell, 1974).

Cebrián *et al.* (1993) mencionan que en el acocil *Procambarus clarkii*, la toxicidad del lindano, pesticida organoclorado, fue seis veces más alta en 29 que en 24°C y lo mismo sucedió con el endosulfán en un intervalo térmico similar; en este caso la toxicidad en la temperatura más alta fue cuatro veces superior en la observada en 24°C. En dicho trabajo también se evaluó la acumulación de los plaguicidas en las branquias de *P. clarkii* tanto en concentraciones letales como subletales; los resultados indicaron que la bioacumulación fue dependiente de la concentración y aumentó al incrementarse la temperatura.

Las respuestas del organismo a la temperatura son importantes en ecotoxicología, debido a que es el factor ecológico que limita la distribu-

ción de los organismos, a la vez que puede ser un factor letal. En referencia a los contaminantes, son importantes las respuestas de comportamiento tales como la selección, evitación y atracción así como las respuestas de tolerancia y de resistencia térmica. Cherry y Cairns (1982) citan que el DDT y sus derivados alteran el preferendum final de temperatura de los peces. La capacidad de los animales de evitar las aguas contaminadas con plaguicidas estimula la sobrevivencia, por lo que esta respuesta sería desastrosa para la población si no pudiera alcanzar un área donde normalmente ocurre el desove (Duke y Dumas, 1974).

Los bifenilos policlorados (BPC), producidos en la manufactura de plásticos, penetran en los cuerpos de agua en cantidades significativas; son polifílicos y a menudo se acumulan en los tejidos de los organismos; son altamente tóxicos para los animales marinos. Los mecanismos de toxicidad se asocian con la inhibición de ATPasas en varios tejidos. La inhibición de la Na-K-ATPasa branquial, interfiere el transporte de iones y altera la función osmorreguladora; se conoce que dicha alteración es especie-dependiente. Así, en *Palaemonetes pugio*, reguladores tanto en el medio diluido como en el medio concentrado, los BPC no modificaron el patrón de regulación entre 2 y 32‰; en cambio en *Penaeus aztecus* en bajas salinidades, se observó una disminución de los iones sodio, potasio y calcio en la hemolinfa, sin cambio aparente en la concentración osmótica (Roesijadi *et al.*, 1976a y b)

Por otra parte el endosulfán, al igual que otros plaguicidas, es ampliamente utilizado en agricultura debido a que su persistencia en el medio es menor que los de otros plaguicidas de reconocida toxicidad como el endrín y el DDT. El efecto tóxico del endosulfán ha sido ampliamente reconocido a diferentes niveles de organización biológica tanto en moluscos, como en crustáceos y peces (Naqvy y Vaishnavi, 1993). Los autores mencionan que causa alteraciones en las concentraciones de sodio y de potasio y disminución en los niveles de calcio y magnesio en plasma, así como inhibición de la Na-K-Mg-ATPasa branquial, en peces. En moluscos y crustáceos, hacen referencia a una disminución de aminoácidos libres en hemolinfa y a la inhibición de Na-K-ATPasa branquial. Tales perturbaciones alteran la osmoregulación y

el consumo de oxígeno de los organismos, lo que a su vez repercute en su actividad normal. Dichos efectos se asocian a la acción neurotóxica del endosulfán. También se menciona al-

teraciones en la reproducción y el crecimiento de crustáceos y moluscos bivalvos. La toxicidad del endosulfán es mayor en los peces que en los invertebrados.

CONSIDERACIONES GENERALES

En este capítulo se destaca la íntima relación que existe entre la ecofisiología y la ecotoxicología, con base en la definición proporcionada por Jepson (1990) sobre esta última. Es claro que la ecofisiología proporciona los fundamentos para un estudio ecotoxicológico centrado en el organismo ya que permite conocer la capacidad de respuesta de las especies al medio fluctuante y complejo, dentro de sus límites genéticos, así como las respuestas de resistencia en el medio alterado por perturbaciones antropogénicas. Como lo señala Koeman (1991), tal reconocimiento es útil para identificar las especies y los procesos fisiológicos susceptibles a la acción tóxica de un contaminante particular en condiciones de laboratorio y en el campo, teniendo en cuenta que la susceptibilidad se refiere a las respuestas genéticamente determinadas.

En ecofisiología, las respuestas del organismo a su entorno abiótico, se explican a través de los mecanismos y procesos que se llevan a cabo a nivel suborganismo hasta el nivel bioquímico celular, donde están comprendidas todas las reacciones químicas que tienen lugar en dichos procesos esenciales para la vida. Por lo tanto, se enfatiza la importancia de obtener los datos ecofisiológicos de los organismos en sus diferentes estadios de desarrollo, antes de abocarse a los estudios ecotoxicológicos. Consecuentemente, para el ecofisiólogo todos estos niveles de organización biológica son igualmente importantes. Para el ecotoxicólogo, en cambio, las variables medidas a niveles inferiores en la jerarquía biológica, solo son relevantes si pueden trascender hacia los niveles superiores. Addams (1990) refiere que las respuestas de estrés medidas en el organismo cubren un intervalo entre el nivel celular y bioquímico hasta el ecosistema y a través de las interacciones que se producen, "las respuestas se segregan a lo largo de un gradiente de relevancia toxicológica y ecológica y de tiempos de respuesta".

Así, en tanto que los estudios con enfoque ecofisiológico constituye la base, los ecotoxicológicos se enfocan hacia la comprensión de las relaciones causales entre los estresores y el efecto que se manifiesta a niveles altos de organización biológica. Pratt (1990), destaca que la importancia de detectar los efectos adversos a nivel de comunidad y ecosistema radica en que permiten normar la penetración de las sustancias químicas tóxicas en los ecosistemas, especialmente en lo que respecta a los plaguicidas.

El concepto de estrés está profundamente compenetrado en este tipo de estudios y como tiene acepción fisiológica, se refiere al organismo. Cualquier perturbación ambiental que desvíe la energía metabólica de las actividades normales del animal, que interfiera con los mecanismos estabilizadores de la homeostasis, que imposibilite la sobrevivencia a largo plazo del organismo, es considerado un estresor. Los animales acuáticos tienen la capacidad de tolerar cierta intensidad de estrés, pero los contaminantes aún en bajas concentraciones recargan los sistemas fisiológicos, lo cual resulta en una disminución de la energía necesaria para el crecimiento y reproducción. Tales efectos trascienden a niveles jerárquicos superiores.

En la actualidad, la preocupación por el daño que las sustancias tóxicas ocasionan en el medio receptor, ha estimulado la búsqueda de métodos de detección y evaluación del deterioro ambiental y modelos que permitan predecir los efectos deletéreos antes que el daño sea irreversible.

Debido a lo anterior es comprensible que los estudios de contaminación donde solo se detecten y cuantifiquen los contaminantes químicos en el agua, no permiten establecer vínculos entre dichos estresores y el daño producido a niveles ecológicos (Pratt, 1990). No obstante, los estudios de laboratorio como las pruebas

de toxicidad, aun con sus numerosas deficiencias, permiten establecer una relación entre la concentración del tóxico en el medio y el efecto sobre el organismo; en este caso el estrés último, la mortalidad. También facultan, en cierta medida, la predicción del efecto biológico que podrían tener los niveles del tóxico en el agua. Si se examinan las concentraciones del contaminante en los tejidos de los animales de prueba y se establecen las relaciones entre dosis y respuesta fisiológica, el contexto ecofisiológico, es posible aportar información a la base de datos necesaria para la investigación toxicológica (Fig 7).

En las tablas 1, 2 y 3 se compendian los principales efectos de los contaminantes, seleccionados con base en la trascendencia que tienen sobre los organismos acuáticos: ciertos metales pesados, el petróleo y sus derivados y también se mencionan los plaguicidas.

Los estudios sobre los metales pesados han recibido considerable atención, principalmente en lo que respecta a la toxicidad y en menor grado a lo que se refiere a la bioacumulación.

También son numerosos los estudios sobre la contaminación producida por hidrocarburos y plaguicidas, aunque se requiere profundizar en los mecanismos de toxicidad ya que son numerosos los factores que la modifican. La toxicidad esta determinada por la disponibilidad real de los contaminantes en el ambiente, por las transformaciones que experimentan en el en el medio marino y por las interacciones que se producen entre ellos. En los animales, la toxicidad depende de las formas y vías de captación; de la concentración y tiempo de exposición al tóxico y de la sensibilidad y tolerancia de la especie. Depende también del tamaño, del estado de desarrollo y de la condición fisiológica del organismo.

También es indispensable tener en cuenta la acción de los factores ambientales. Esto permite enfatizar el valor de los estudios experimentales multifactoriales, sobre el efecto de la contaminación subletal (Fig. 8).

Con el tiempo, la aplicación del enfoque denominado RCEA ("QSAR") referido a la Relación Cuántica de Estructura-Actividad, facilitaría la

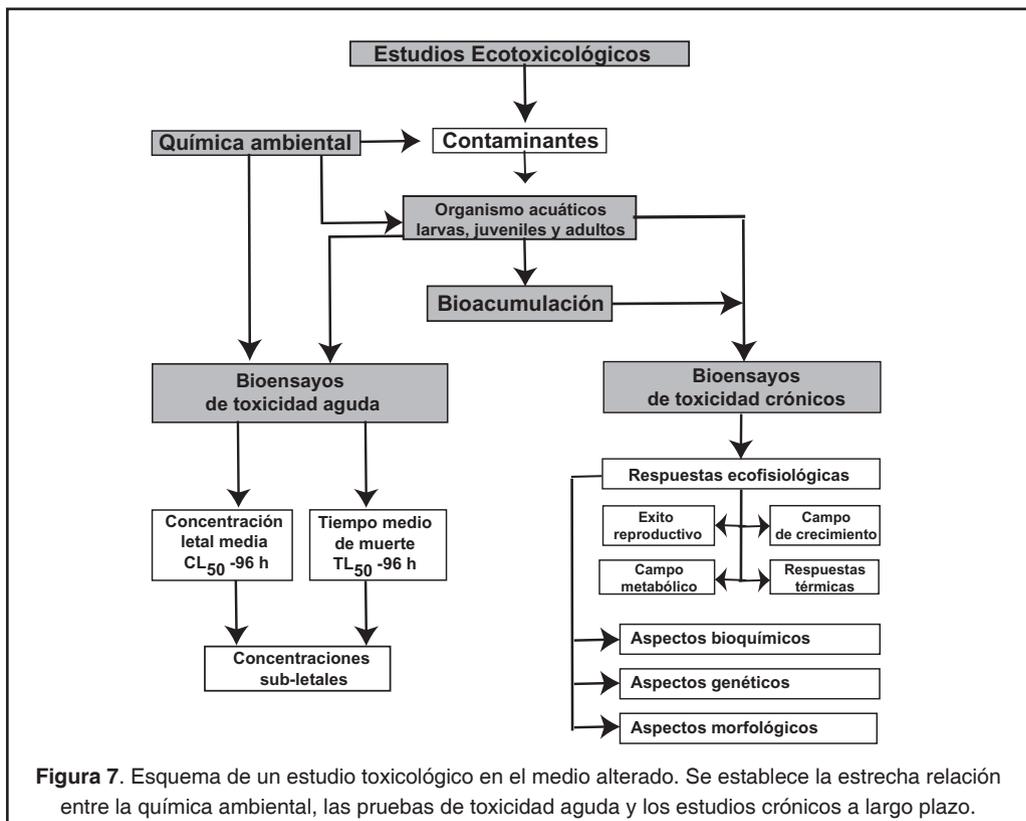


Figura 7. Esquema de un estudio toxicológico en el medio alterado. Se establece la estrecha relación entre la química ambiental, las pruebas de toxicidad aguda y los estudios crónicos a largo plazo.

Tabla 1. Algunos efectos que producen los metales pesados en organismos acuáticos.

Efectos a Nivel General		
Los metales pesados afectan diversas funciones fisiológicas a nivel respiratorio, excretor, nutricional, osmorregulador y también el crecimiento y el comportamiento de peces, crustáceos y moluscos. Alteran el metabolismo del calcio en moluscos; la regulación hidromineral y el equilibrio ácido-básico en peces y crustáceos; aumentan el costo en oxígeno en la ventilación; inhiben los neurotransmisores, lo que produce modificaciones en la tasa de filtración de moluscos y los quimio-receptores en peces, lo cual interfiere el apareamiento, las migraciones reproductivas, la formación de cardúmenes, el reconocimiento de depredadores, la alimentación y el crecimiento en peces; alteran el desarrollo, producen esterilidad y muerte en moluscos. Disminuyen el campo de crecimiento.		
Efectos a Nivel Específico		
Metales	Especie	Observaciones
Cd	<i>Artemia sp</i>	Retarda el desarrollo y la eclosión de embriones.
Cd y Hg	<i>Uca pugilator</i>	Perturbaciones en la respiración y osmorregulación. En larvas disminuye la tasa metabólica con incapacidad para escapar de depredadores y capturar el alimento.
Cd	<i>Peneaus aztecus</i> <i>P. setiferus</i>	Disminuye la tasa metabólica dependiente de la concentración.
Cd	<i>Lypomisis ligvura</i>	Disminuye la tasa metabólica.
Cd	Peces	Reduce la tolerancia térmica.
Cu	<i>Mytilus edulis</i>	Inflamación y necrosis de túbulos digestivos, alteración de balance redox en glándula digestiva y branquias. El estrés oxidativo produce aumento de calcio en las células. Afecta tasa respiratoria.
Cu	<i>Mytilus californianus</i>	Altera la tasa de filtración.
Cu	<i>Carcinus maenas</i>	Produce acidosis metabólica.
Cu y Hg	Crustáceos	Inhibe asentamiento de larvas.
Cu y Hg	Peces <i>Coho salmon</i>	Altera procesos de alimentación, actividad natatoria y el aprendizaje. Modificaciones en el comportamiento.
Cu, Cd y Zn	<i>Palaemonetes pugio</i>	Estimula la síntesis de metalotioneínas con detrimento de proteínas asociadas con reparación de tejidos.
Cu, Hg, Cd, Pb, y Zn	<i>Cancer anthony</i> <i>C. magister</i>	Altamente tóxico para embriones.
Cr, Fe y Mn		Letal para embriones. Retardan la eclosión de embriones.
Sn	<i>Scrobicularia plana</i>	Tributil estaño causa la muerte.
Sn	<i>Nucella lapidus</i> <i>Ocenebra erinacea</i>	El estaño de las pinturas para barcos produce "imposex", fenómeno que produce esterilidad al transformar hembras en machos.
Sn	<i>Arca zbra</i>	El aquil estaño produce perturbaciones en el metabolismo aerobio
Metales pesados de lodos de perforación	Corales	Fe y Mn retardan eclosión de embriones Cr letal para embriones Cd, Cu, Hg, Pb y Zn altamente tóxicos para los embriones

predicción del efecto de los compuestos orgánicos tóxicos sobre el organismo a partir de su cuantificación en el medio. Widdows y Donkin, (1991) refieren que "es posible agrupar los compuestos relacionados estructuralmente y predecir el factor de bioconcentración y los efectos tóxicos basándose en sus propiedades fisicoquímicas". También argumentan que los efectos tóxicos de compuestos que forman una sola línea RCEA y que por tanto comparten un mismo mecanismo de toxicidad, son aditivos cuando se encuentran en mezclas complejas; los autores mencionan que esto ha sido comprobado.

Se reconoce que la extrapolación, de las respuestas evaluadas, de un nivel a otro en la jerarquía biológica, presenta serias dificultades; de organismo a ecosistema las escalas de espacio y de tiempo son diferentes. Además, las poblaciones naturales difieren en cuanto a la distribución espacial y temporal, así como en la abundancia y en las estructuras de edades (De Kruijf, 1991). Dichas características, a menudo son ignoradas cuando se efectúan extrapolaciones de los estudios de laboratorio al campo (Seitz y Ratte, 1991). Por otra parte, Bayne (1985) señala que es fundamental establecer las relaciones causales que enlazan las res-

Tabla 2. Algunos efectos que producen el petróleo y sus derivados en organismos acuáticos.

Efectos a Nivel General		
El petróleo dispersado en agua, la fracción soluble de éste y los hidrocarburos derivados interfieren con el metabolismo general de moluscos y crustáceos al aumentar o disminuir el consumo de oxígeno dependiendo de la concentración. Alteran la estructura de las membranas en lo que concierne a la fluidez. Al actuar como anestésicos disminuyen la actividad ciliar, lo cual interfiere con la alimentación en moluscos; inhiben la secreción de hilos bisales. Disminuye la fecundidad, el crecimiento y el campo de crecimiento de los organismos acuáticos.		
Efectos a Nivel Específico		
Contaminantes	Especie	Observaciones
Hidrocarburos	<i>Mytilus edulis</i>	Interfiere la síntesis de proteínas estructurales ya que estimula la degradación de las proteínas de la glándula digestiva.
Hidrocarburos	<i>Arca zebra</i>	Provocan disminución de la tasa de filtración. Disminuye el campo de crecimiento.
Hidrocarburos	<i>Venus verrucosa</i>	Disminuye la tasa de alimentación y el campo de crecimiento. Interfiere el metabolismo de los lípidos, produciendo deficiencias de ácidos grasos esenciales.
Hidrocarburos	<i>Mytilus edulis</i>	Provocan disminución de fosfolípidos, lo cual altera las respuestas adaptativas y energéticas.
Hidrocarburos	<i>Carcinus maenas</i> <i>Momarus americanus</i>	Inhiben el proceso de alimentación, consecuencias de alteraciones morfológicas y funcionales de la glándula digestiva.
Naftaleno	<i>Gammarus mucronatus</i> <i>Amphithoe valida</i>	Concentraciones menores a 0.8 ppm son tóxicas. El dimetil naftaleno es más tóxico que el compuesto aislado.
Benceno	<i>Cuplea pallasi</i> <i>Engraulis mordax</i>	En larvas cambia el consumo de oxígeno dependiendo de la concentración (narcótico). Anormalidades en embriones.
Fracción soluble en agua (FSA) de petróleo Esso extra No. 2	<i>Mytilus edulis</i>	Inhibición del consumo de oxígeno.
FSA del petróleo crudo	<i>Sphaeroma quadridentatus</i>	Exposiciones al 1% FSA disminuye la fecundidad; exposiciones menores del 3% FSA disminuye el crecimiento: Todos los animales mueren después de 5 semanas de la exposición.
FSA del petróleo crudo	<i>Cragnon cragnon</i>	Cambios de la tasa respiratoria dependiendo de la temperatura. Disminuye crecimiento. Disminución de ambas tasas dependiendo de la concentración.
FSA del petróleo Ixtoc-I	<i>Penaeus aztecus</i>	Letal al 43% FSA; CL ₅₀ -24 h: 25% FSA a 30°C y 23‰; en concentraciones subletales disminuye el punto isosmótico, probablemente por alteraciones en la permeabilidad.
FSA petróleo Istmo-cactus	Algas en cultivo: Baciliariofitas, crisofitas, clorofitas	Altera fotosíntesis por lo que se inhibe el crecimiento.
Petróleo crudo	Moluscos	Alteraciones en el metabolismo de los lípidos; tóxico.
Petróleo dispersado en agua	Ecosistemas experimentales	Efecto crónico a bajos niveles; disminuye la diversidad de meiofauna y macrofauna.
Petróleo, diesel+cadmio	<i>Mytilus edulis</i>	Disminuye el campo de crecimiento dependiendo de la concentración.
Lodos de perforación	Corales escleractinios	Muerte en concentraciones mayores de 100 µl/l.

puestas del organismo con atributos fisiológicos de su adecuación al medio, antes que los efectos provocados por los estresores sean extrapolables a las comunidades y a los ecosistemas.

En este sentido, es necesario conocer la relación entre la concentración del contaminante en los tejidos y el efecto que produce en el animal, una vez que se haya determinado sus res-

puestas a los cambios ambientales naturales. Widdows y Donkin, (1991) mencionan que la medición del balance energético, es idealmente adecuada para tal propósito. Cabe recordar que el campo de crecimiento refleja algunos de los principales mecanismos de toxicidad ya que engloba varias respuestas fisiológicas que incluyen desde la adquisición de la energía hasta el disponible para crecimiento y reproducción, una vez desconectadas la fracción utilizada en

Tabla 3. Algunos efectos producidos por plaguicidas en organismos acuáticos.

Efectos a Nivel General		
Los plaguicidas afectan al metabolismo general; se ha observado disminución de acetilcolinesterasa y adenosinfosfatasa en peces. Producen disminución de los lípidos totales con aumento de productos de degradación, atribuidos al aumento de los niveles de lipasa. También provocan cambios en la síntesis de fosfolípidos y pueden producir deficiencias en ácidos grasos esenciales. Inhiben el almacenamiento de reservas asociadas con procesos de reproducción y con la activación de hormonas durante el proceso de muda; reducen la capacidad osmorreguladora en crustáceos. Interfieren el proceso de alimentación en moluscos. Modifican adversamente la selección de temperatura y disminuyen la tolerancia térmica de los peces.		
Efectos a Nivel Específico		
Contaminante	Especie	Observaciones
Plaguicidas	<i>Mytilus edulis</i> <i>Carcinus maenas</i> <i>Homarus americanus</i>	Interfieren el metabolismo de lípidos. Deficiencias de ácidos grasos esenciales. Alteraciones en la estructura de las membranas. Inhibición de hormonas esteroides durante la muda de crustáceos. Alteraciones estructurales y funcionales de la glándula digestiva en moluscos.
Plaguicidas	<i>Cancer magister</i> <i>Hemigrapsus nudus</i>	Reducen capacidad osmorreguladora.
DDT y derivados	Peces	Alteran las respuestas a la temperatura.
Fosfamidón Metilparatión Lindano	<i>Metapeaeus monoceros</i> <i>Homarus americanus</i> <i>Clupea harengus</i>	Disminución de los lípidos totales. Interfieren en el metabolismo aerobio.

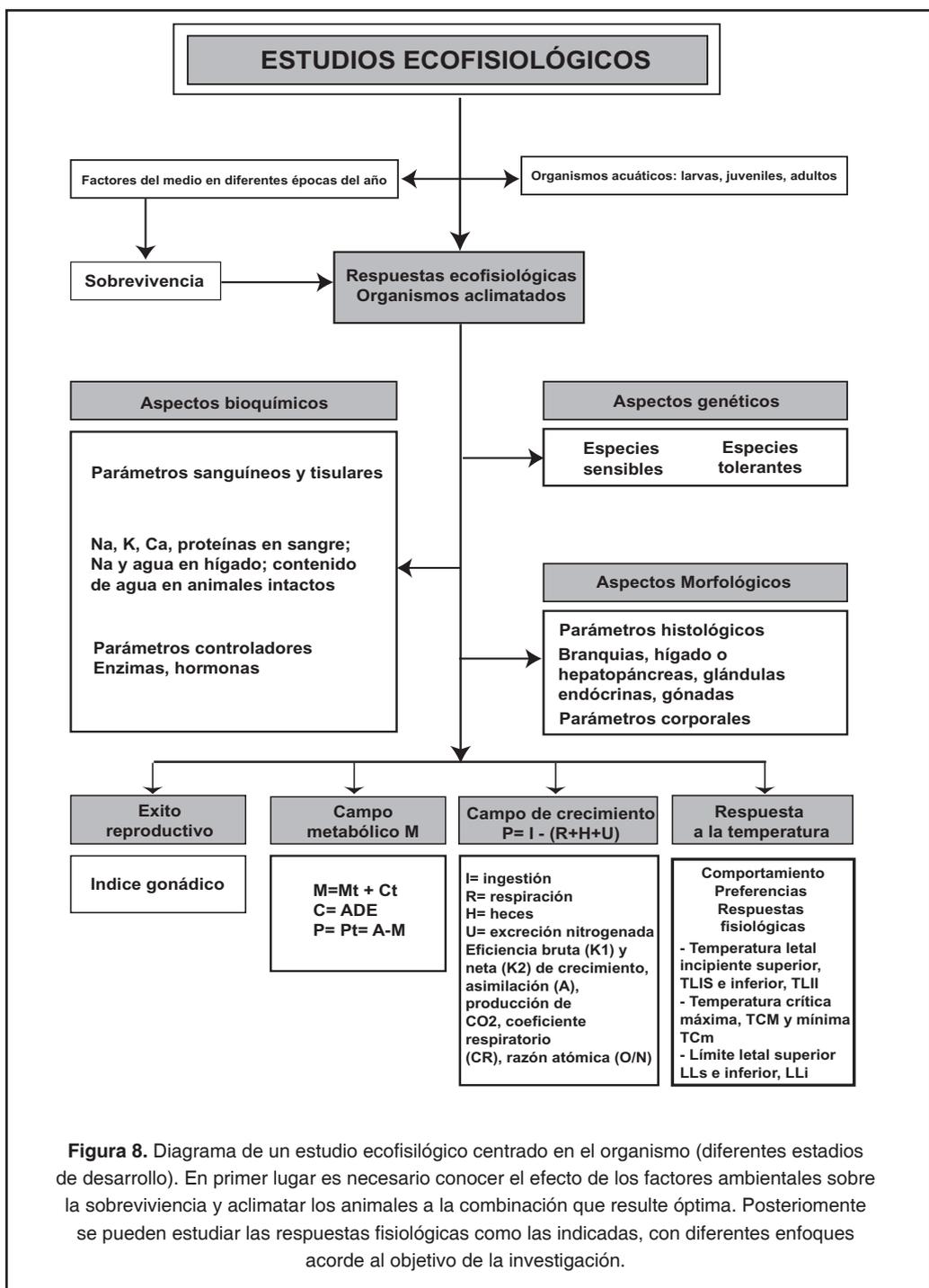
procesos metabólicos y la contenida en los productos de desecho.

La determinación del campo de crecimiento de los organismos resulta adecuada porque en esta respuesta se integran las consecuencias de los mecanismos de toxicidad múltiples, es posible comprender y predecir los efectos de mezclas complejas de los tóxicos, tiene aplicación tanto en el laboratorio como en el campo y relevancia ecológica. Widdows y Donkin, (1991) han comprobado estas propiedades trabajando con mejillones en el laboratorio, en mesocosmos y en el medio natural, midiendo el campo de crecimiento en especímenes expuestos a hidrocarburos, fenoles tributilestaño, plomo, cobre y otros metales. Aunque han logrado predecir los efectos de los contaminantes e interpretar las causas de dichos efectos, mencionan que "se requiere mayor investigación para poder proporcionar una interpretación ecotoxicológica mas profunda".

A pesar de la complejidad del problema, es estimulante conocer que actualmente se han desarrollado este tipo de investigaciones tendientes a establecer relaciones cuantitativas entre experimentos de campo y laboratorio y entre diferentes niveles de organización biológica, sub-organismo-población a la vez que se han planteado modelos con capacidad predictiva hacia niveles jerárquicos superiores.

En este contexto Koeman (1991) considera que los estudios ecofisiológicos, de un amplio espectro de especies -sobre los que hay bastantes aportaciones- pueden contribuir a la determinación del riesgo toxicológico de las sustancias tóxicas. Este concepto se puede definir de varias maneras, aunque algunos autores lo utilizan en el sentido estadístico; esto es, como la probabilidad de lesión, daño o muerte resultante de la exposición del organismo a la sustancia determinada (Moore *et al.*, 1990). El análisis de riesgo es útil para estimar los efectos producidos en el medio natural de las pruebas de toxicidad obtenidas en el laboratorio.

Para De Kruijf (1991), la determinación del riesgo ecológico para el ecosistema, significa identificar el nivel en el cual se produce el estrés causado por los contaminantes, y con qué intensidad, Para que pueda trascender a jerarquías superiores y poner en peligro al ecosistema impidiendo el retorno a su condición natural. El autor propone un modelo en el que engloba el enfoque del balance energético y el enfoque de punto final, donde el hombre es el principal argumento. En este, cualquier cambio producido en el ecosistema es relevante solo si se relaciona con el hombre, de manera directa o indirecta.



De lo anterior también es posible inferir, que para abordar el problema de la contaminación acuática, se requieren esfuerzos multidiscipli-

narios; solo así se podrá alcanzar el objetivo final, referido a la protección del hombre, del ambiente y de sus recursos.

LITERATURA CITADA

- Addams, S.M., 1990.** Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. p. 1-8. In: S. M. Addams (Ed) *Biological Indicators of Stress in Fish*. A Fisheries Society Symposium. Bethesda, Maryland.
- Addison, R.F. 1988.** Biochemical effects of a pollutant gradient. Introduction. *Marine Ecology Progress Series* 46: 31-32.
- Ahsanullah, M y A.R. Williams, 1991.** Sublethal effects and bioaccumulation of cadmium, chromium, copper and zinc in the marine amphipod *Allochertes compressa*. *Marine Biology*, 108:59-65.
- Albert, L.A. 1988.** Curso Básico de Contaminación Ambiental. Editorial LIMUSA, SA de CV., México, D. F.
- Anderson J.W. , J.M. Neff, B.A. Cox , H.E. Tatem y G.M. Hightower, 1974.** The effect of oil on estuarine animals.: Toxicity, uptake and depuration, respiration, p. 285-310. In: F.J. Vernberg and W.B Vernberg (Eds). *Pollution and Physiology of Marine Organisms*. Academic Press inc. New York.
- Auffret, M. 1988.** Histopathological changes related to chemical contamination in *Mytilus edulis* from field and experimental conditions. *Marine Ecology Progress Series*. 46:101- 107.
- Axiak, V., y J.J. George, 1987.** Effects of exposure to petroleum hydrocarbons on the gill function and ciliary activities of a marine bivalve. *Marine Biology*, 94: 241-249.
- Axiak, V., J.J. George, y N.M. Moore, 1988.** Petroleum hydrocarbons in the marine bivalve *Venus verrucosa*: accumulation and cellular responses. *Marine Biology*, 97 : 225-230.
- Bagshaw, J.C., P. Rafice, C.O. Mathews y T.H. MacRae, 1986.** Cadmium and zinc reversibility arrest development of *Artemia larvae*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 37: 289-296.
- Bakke, T. 1988.** Physiological energetics of *Littorina littorea* under combined pollutant stress in field and mesocosm studies. *Marine Ecology Progress Series*, 46:123- 128.
- Barrera, R. 1982.** Bases metodológicas experimentales para determinar el efecto de la fracción soluble en agua del petróleo crudo sobre las respuestas fisiológicas: supervivencia y osmoregulación del camarón café *Penaeus aztecus*, Ives. Tesis de licenciatura en biología. Facultad de ciencias Univ. Nal. Auto. México. 80 p.
- Barrera, R. y S. Espina, 1984.** Efecto de la fracción soluble en agua del petróleo crudo sobre la sobrevivencia de *Penaeus aztecus*, Ives. IV Conferencia Científica de las Ciencias Naturales. Universidad de la Habana, Cuba.
- Battaglini, P. G. Andreozzi, R. Antonucci, N. Arcamone, P. De Girolamo, L. Ferrara y G. Gargiulo, 1993.** The effects of cadmium on the gill of the goldfish *Carassius auratus*. I. Metal uptake and histochemical changes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 104C:239-247.
- Bayne, B.L., 1985.** Ecological consequences of stress, p. 135-141. In: B. L. Bayne (Ed). *The Effect and Pollution on Marine Animals*. Praeger scientific studies, New York.
- Bayne, B.L. Widdows J y T.J. Thompson, 1976.** Physiological integrations, p. 261-291. In: B. L. Bayne (Ed) *Marine Mussels: Their Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bayne, B.L y F.P. Thurberg, 1988.** Physiological measurement on *Nucula tenuis* and on isolated gills of *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas*. *Marine Ecology Progress Series*, 46:129- 134.
- Bierkens J. y R. Simkiss, 1990.** The use of chemical analogues Duch a Eu/Am in ecotoxicological studies. *Functional Ecology*, 4:445-447.
- Bjerregaard, P., 1990.** Influence of physiological condition of cadmium transport from haemolymph to hepatopancreas in *Carcinus maenas*. *Marine Ecology Progress Series*, 106:199-209
- Bjerregaard, P. y M.H. Depledge, 1994.** Cadmium accumulation in *Littorina littorea*, *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas*. *Marine Biology*, 106:385-395.
- Boitel, F., y J.P. Truchot, 1989.** Effects of sublethal copper on hemolymph, acid-base balance and ion concentrations in the shore crab *Carcinus maenas* kept in undiluted sea water. *Marine Biology*, 103: 491-501.
- Botello, A. V., 1975.** Utilización y degradación del petróleo crudo por dos especies de camarón *P. duorarum* y *P. aztecus*. *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología*, 2(1): 67-72.
- Botello, A. V., G.P. Vélez, A. Toledo, G. Díaz-González, y S. Villanueva. 1992.** Ecología, recursos costeros y contaminación en el Golfo de México. *Ciencia y Desarrollo*, 17:28-48.

- Brouwer, A., A.J. Muro y J.H. Koeman., 1990.** Biochemical and physiological approaches in ecotoxicology. *Functional Ecology*, 4:275-281.
- Bryan, G.W. 1976.** Some aspects of heavy metal tolerance in aquatic organisms, p. 7-34. *In:* A.P.M. Lockwood (Ed). Effects of Pollutants of Aquatic Organisms. Cambridge University Press, Cambridge.
- Buykema, A. L. Jr., B.K. Niederleimer, y J. Cairns, Jr. 1982.** Biological monitoring. IV-Toxicity testing. *Water Research*, 16: 239-262.
- Cairns Jr. J, 1982.** Introduction, p. 7-11. *In:* J. Cairns Jr. (Ed). Biological Monitoring in Water Pollution. Pergamon Press, New York.
- Cairns Jr. J, A.G. Heath, y B.C. Parker, 1975.** The effect of temperature upon toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiology*, 47: 135-171.
- Cairns Jr. J., y W.H. Vander Schalie, 1982.** Biological monitoring. I-Early warning systems. *Water Research*, 14: 1179-1196.
- Cairns M.A. y R.R. Garton, 1982.** Use of fish ventilation frequency to estimated chronically safe toxicant concentrations. *Transaction of American Fisheries Society*, 111: 70-77.
- Caldwell, R. S. 1974.** Osmotic and ionic regulation in decapod crustacea exposed to methoxychlor, p. 165-180. *In:* F.J. Vernberg and W.B Vernberg (Eds). Pollution and Physiology of Marine Organisms. Academic Press inc. New York.
- Calow P. Y R.M. Sibly, 1990.** A. physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. *Functional Ecology*, 4: 283-288.
- Capuzzo, J.M. 1988.** Physiological effects of a pollutant gradient summary. *Marine Ecology Progress Series*, 46: 147-148.
- Capuzzo, J.M. y D.F. Leavitt, 1988.** Lipid composition on the digestive gland of *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* response to pollutant gradients. *Marine. Ecology progress series*. 46: 139-145.
- Castro, V, 1995.** Efecto de concentraciones subletales de cadmio en algunas respuestas fisiológicas en los juveniles *Penaeus setiferus* (Crustácea: Decapoda) de la laguna de Términos, Campeche. Tesis Profesional en Biología. BUAP. 57 p.
- Cebrián, C., E. Andreu Moliner y M. Gamon, 1993.** The effect of time, concentration and temperature on bioaccumulation in the gill of crayfish *Procambarus clarkii* induced by organochloride pesticides, lindane and endosulfan. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 104C: 445-451.
- Coleman, N., F.T. Mann, M. Mobley y N. Hickman, 1986.** *Mytilus edulis* planulatus: an "integrator" of cadmium pollution?. *Marine Biology*, 92:1-5.
- Cherry, D.S. y J. Cairns Jr, 1982.** Biological monitoring. V-preference and avoidance studies. *Water Research*, 16:263-301.
- D'Agostino, A. C., y C. Finney, 1974.** The effect of copper and cadmium on the development of *Tigriopus japonicus*, p. 445-463. *In:* F.J. Vernberg and W.B Vernberg (Eds). Pollution and Physiology of Marine Organisms. Academic Press Inc. New York.
- Dalal, R. y S. Battacharya, 1994.** Effect of cadmium, mercury, and zinc on the hepatic microsomal enzymes of *Channa punctatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 52: 893-897.
- Davison, W., C.E. Franklin, J.C. MacKenzie y M.C.R. Dougan, 1992.** The effects of acute exposure to the water soluble fraction of diesel fuel oil on survival and metabolic rate of an antarctic fish (*Pagothenia borchgrevinki*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 102C: 185-188.
- De Kruijff, H.A. M., 1991.** Extrapolation through hierarchical levels. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C:301-304
- Dunning, A., y C. W. Major, 1974.** The effect of cold sea water oil extracts upon the blue mussel, *Mytilus edulis*, p. 349-366. *In:* F.J. Vernberg and W.B Vernberg (Eds). Pollution and Physiology of Marine Organisms. Academic Press inc. New York.
- Duke, T.W., y D.P. Dumas, 1974.** Implications of pesticides residues in the coastal environment, p. 137-164 *In:* F.J. Vernberg and W.B Vernberg (Eds). Pollution and Physiology of Marine Organisms. Academic Press inc. New York.
- Eddy, F.B. 1981.** Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish p. 77-102. *In:* A.D. Pickering (Ed). Stress and Fish. Academic Press Inc. Ltd. London.
- Edwards, R.R.C., 1978.** Effects of water-soluble oil fractions on metabolism. Growth and carbon budget on the shrimp *Cragon cragon*. *Marine Biology*, 46:259-265.
- Engel, D.W. y M. Brouwe, 1987.** Metal regulation and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus*: Metallothionein function in metal metabolism. *Biological Bulletin*, 173: 239-251.

- Espina, S. A. Muñoz, R. Villalobos, F. Díaz, J. Latournerié, A. Sánchez, 1976.** Metabolismo respiratorio y osmoconcentración en dos especies de peneidos de la laguna de Mandinga Ver., México, p. 27-50. *In: Mem. del Simposium sobre Biología y Dinámica Poblacional de Camarones, Guaymas, Sonora. Agosto 8-13.*
- Evtushenko, Z S., O.N. Lukyanova y N.N. Belcheva, 1990.** Cadmium bioaccumulation in organs of the scallop *Mizuhopecten yessoensis*. *Marine Biology*, 104: 247-250.
- Frank P., y P. Robertson, 1979.** Tof salinity on toxicity of cadmium and chromium to the blue crabs *Callinectes sapidus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 21: 74-78.
- Freedman, B. 1989.** Environmental Ecology. The impact of pollution and other stresses on ecosystem structure and function. Academic Press, New York.
- Gaudy, R., J.P. Guerin y P. Keranbrum, 1991.** Sublethal effects of cadmium on respiratory, metabolism, nutrition, excretion and hydrolase activity in *Leptomysis lingvura* Crustácea: (Mysidacea). *Marine Biology*, 109:493-501.
- GESAMP (IMO / FAO / UNESCO / WMO / WHO / IAEA / UN / UNEP Joint Group of Expert on the Scientific Aspect of Marine Pollution), 1980.** Monitoring biological variables related to marine pollution UNEP. *Regional Seas Report and Studies*, No. 11: 1-22
- GESAMP (IMO / FAO / UNESCO / WMO / WHO / IAEA / UN / UNEP Joint Group of Expert on the Scientific Aspect of Marine Pollution), 1985.** Cadmium, lead and tin in the marine environment. UNEP. *Regional Seas Report and Studies*, 56:1-190.
- Gettleson, D.A., 1980.** Effects of oil and gas drilling operations on the marine environment, p. 371-411. *In: R.A. Geyer (Ed). Environmental Pollution Hydrocarbons. Elsevier Oceanography Series. Scientific Publication Company, New York.*
- Giesy, J.P., J.W. Bowlin y H.J. Kania, 1980.** Cadmium and zinc accumulation and elimination by freshwater crayfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 9:683-692.
- Grassle, J.F., 1981.** Response of benthic communities in MERL experimental ecosystem to low level, chronic additions of No. 2 fuel oil. *Marine Environment*, 4: 279-297.
- Gray, J.S., 1974.** Synergistic effect of three heavy metals on growth rates of a marine ciliate protoozan, p. 465-485. *In: F.J. Vernberg and W.B Vernberg (Eds). Pollution and Physiology of Marine Organisms. Academic Press inc. New York.*
- Green, F. A. Jr, J.W. Anderson, S.R. Petrocelli, B.J. Presley y R. Sims, 1976.** Effect of mercury on the survival, respiration and growth of post-larval white shrimp, *Penaeus setiferus*. *Marine biology*, 37:75-81.
- Handy, R.D., 1994.** Intermittent exposure to aquatic pollutants: assessment, toxicity and sublethal responses in fish and invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 107C:171-184.
- Hansen, J.I., T. Mustafa y M. Depledge, 1992a.** Mechanisms of copper toxicity in the shore crab *Carcinus maenas*. I. Effects on Na, K, ATPase activity, hemolymph electrolyte concentration and tissue water content. *Marine Biology*, 114: 253-257.
- Hansen, J.I., T. Mustafa y M. Depledge, 1992b.** Mechanisms of copper toxicity in the shore crab *Carcinus maenas*. II. Effect on key metabolic enzymes, metabolites and energy charge potential. *Marine Biology*, 114: 259-264.
- Hawkins, L.E. y S. Hutchinson, 1990.** Physiological and morphogenetic effect of monopheniltin trichloride on *Ocenebra erinacea*. *Functional Ecology*, 4:449-454.
- Heat, A.G. 1990.** Summary and perspectives, p. 183-191. *In: S. M. Addams (Ed) Biological Indicators of Stress in Fish. American Fisheries Society Symposium Bethesda, Maryland.*
- Hinton, D. E., y D.J. Lauren, 1990.** integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. p. 51-66. *In: S. M. Addams (Ed) Biological Indicators of Stress in Fish. American Fisheries Society Symposium. Bethesda, Maryland.*
- Howell, G. 1976.** Introduction, p. 1-5. *In: A.,P.M. Lockwood (Ed). Effect of Pollutant on Aquatic Organisms. Cambridge University press, Cambridge.*
- Hughes, G.M., 1976.** Polluted fish physiology, p. 163-184. *In: A., P.M. Lockwood (Ed). Effect of Pollutant on Aquatic Organisms. Cambridge University press, Cambridge.*
- Hughes, G.M., 1981.** Effects of low oxygen and pollution on the respiratory system on fish, p. 121-146. *In: A.D. Pickering (Ed). Stress and Fish. Academic Press Inc. Ltd. London*
- Jackim, E., 1974.** Enzyme responses to metals in fish, p. 59-66. *In: F.J. Vernberg and W.B Vernberg (Eds). Pollution and Physiology of Marine Organisms. Academic Press Inc. New York.*
- Jepson, P., 1990.** New horizons in ecotoxicology. *Functional Ecology*, 4: 273.

- Jobling, M. 1994.** Fish Bioenergetics. Fish and Fisheries 13. Chapman and Hall, New York 309.
- Jones, M. B. 1975.** Synergistic effects of salinity, temperature and heavy metals on mortality and osmoregulation in marine and estuarine isopods (Crustácea). *Marine Biology*, 30: 13-20.
- Khan, A.T., J.S. Weiss y L. D'Andrea, 1989.** Bioaccumulation of four heavy metals in two populations of grass shrimp *Palaemonetes pugio*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 42:339-343.
- Koeman, J.H., 1991.** From comparative physiology to toxicological risk assessment. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C:7-10.
- Langton, W.J., G.W. Bryan, G.R. Burt y P.E. Gibbs, 1990.** Assessing the impact of tin and TBT in estuaries and coastal regions. *Functional Ecology*, 4:433-443.
- Laughlin, R.B. Jr., y J.M. Neff, 1980.** Influence of temperature, salinity and phenanthrene (a petroleum-derived polycyclic aromatic hydrocarbon) on the respiration of larval mudcrabs *Rithropanopeus harrisi*. *Estuarine Coastal of Marine Science*, 10:655-669.
- Lee, W. Y., y J.A.C. Nicol, 1978.** The effect of naphtalene on survival and activity of the amphipod Parhyak. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 20: 233-240.
- Lemaire, P., J. Berhaut, S. Gony y M. Lafaurye, 1992.** Ultrastructural changes induced by benzo(a)pyrene in sea bass (*Dicentrarchis labrax*) liver and intestine: Importance of the intoxication route. *Environmental Reserarch*, 57:59-72.
- Lin, W., A.R. Michel, y P.K. Chien, 1992.** The effects of copper, cadmium and zinc on particle filtration and uptake of glycine in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 103C: 181-187.
- Linquist, S. 1986.** The heat shock response. *Annual Review of Biochemistry*, 55: 1151-1191.
- Lockwood A.P.M 1976.** Effects of Pollutants of Aquatic Organisms. Cambridge University Press, Cambridge
- Loomis, T.A., 1982.** Fundamentos de Toxicología. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Madsen, K.N. 1992.** Effects of arsenic and survival and metabolism of *Crangon crangon*. *Marine Biology*, 113: 37-44.
- Manahan, S.E., 1983.** Environmental Chemistry, 4th ed. Wilar Grant Press, Boston, 612 p.
- MacHenery, J.G, D. Award y D.D. Seaton, 1991.** Lethal and sublethal effects of the solmon delousing agent dichlorvos on the larva of the lobster (*Hommarus gammaurus* L.) and herring (*Clupea harengus* L). *Aquaculture*, 98:331-347.
- Macnotti, R., J.P. Zaino y R.S. McConnell. 1994.** Pesticide-sensitive fish muscle cholinesterases. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 108C: 187-194.
- Mcdonald, J.M. , J.D. Shield., y R.K. Zimm erFaust, 1988.** Acute toxicities of eleven metals to early live history stages to the yellow crab *Cancer anthony*. *Marine Biology*, 98:201-207.
- McLeese, D.W. y S. Ray, 1986.** Toxicity of CdCl₂ , CdEDTA, CuCl₂ and CuEDTA, to matine invertebrates. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 36: 749-755.
- Mooghan, P.H., C.D. McAuliffe y F.T. Weis, 1980.** Environmental aspects of drilling muds sand cuttings from oil and gas operation in offshore and coastal water, p. 413-432. In: R.A. Geyer (Ed). Environmental Pollution Hydrocarbons. Elsevier Oceanography Series. Scientific Publication Company, New York.
- Moore, D.W., M.D. Schluchter y G.I. Scott, 1990.** Use of hazard models in evaluating the effect to exposure-duration on the acute toxicity of three pesticides, p. 247-263. In: W.G. Landis and W.H. Van Der Schaile (Eds). Aquatic Toxicology and Risk Assesment, Thirteenth volume. ASTM STP 1096. American Society of Testing and Materials, Philadelphia.
- Moore, M.N. 1988.** Cellular and histopathological effects of a pollutant gradient-summary. *Marine Ecology Progress Series*, 46: 109-110.
- Morales Loo, M.R. y M. Gootx, 1990.** Effects of water-soluble fraction of the mexican crude oil "Isthmus Cactus" on growth, cellular content of clorophyla and lipid composition of plancktonic microalgae. *Marine Biology*, 104:503-509.
- Mothershead, R.F., II y R.C. Hale, 1992.** Influence of ecdysis on the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in field exposed blue crabs (*Callinectes sapidus*). *Marine Environmental Research*, 33: 145-156.
- Naqvi, S. Y Ch Vaishnavi, 1993.** Band toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. Mini-review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105C.: 347-361.
- Overstreet, R.M., 1988.** Aquatic pollution problems, Southeastern U.S. coasts. Histopathological indicators. *Aquatic Toxicology*, 11: 213-239.

- Patin, S. A., 1982.** Pollution an the Biological Resources of the Ocean. Butterworth Scientific. London.
- Pequeux, A., 1995.** Osmotic regulation in crustaceans. *Journals Crustacean Biology*, 15:1-60.
- Phillips, D.J.H., 1976.** The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator to pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I Effects of environmental variables on uptake of metals. *Marine Biology*, 38: 59-69.
- Pickering, A.D. 1981.** Introduction.: the concept of biological stress, p.1-7. In: A.D. Pickering (Ed). Stress and Fish. Academic Press. New York.
- Pratt, J.R., 1990.** Aquatic community response to stress: prediction and detection of adverse effects, p. 16-26. In: W.G. Landis and W.H. Van Der Schaile (Eds). Aquatic Toxicology and Risk Assesment, Thirteenth volume. ASTM STP 1096. American Society of Testing and Materials, Philadelphia.
- Rainbow, P.S. y S.I. Whiote, 1989.** Comparative strategies of heavy metal acumulation by crustaceans: zinc, copper and cadmium in a decapod, amphipod and a barnacle. *Hidrobiología*, 174: 245-262.
- Rainbow, P.S., I. Malik y P. O'Brien, 1993.** Physicochemical and physiological effects on the uptake of dissolve zinc and cadmium by the amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*. *Aquatic Toxicology*, 25:15-30.
- Reddy, S.M. y K.V.R. Rao, 1989.** In vivo modification of lipid metabolism in response to phosphamidon, methylparathion and lindane exposure in the penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 43:603-610.
- Reddy, B.C. y M. Fingermann, 1994.** Effect of cadmium chloride on amylase activity in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109C: 309-314.
- Rehnberg, B.CF. y C.B. Schreck, 1986.** Acute metal toxicology on olfaction in *Coho salmon*: behaviour, receptors, and odor-metal complexation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 36: 579-586.
- Ridout, P.S., Rainbown, H.S.J. Roe y H.R. Jones, 1989.** concentrations of V. , Cr, Mmn, Fe, Ni, Co, Cu, As and Cd in mesopelagic crustacean from the Nort East Atlantic Ocean. *Marine Biology*, 100: 465-471.
- Roesijadi, G. J.W. Anderson. R.S. Petrocelli y C.J. Gima, 1976a.** Osmorregulation of the grass shrimp *Palaeomonetes pugio* exponed to polychlorinated biphenyls (PCBS).I. Effect on chloride and osmotic cfoncentrations and chloride and water exchange kinetics. *Marine Biology*, 38: 343-355
- Roesijadi, G. J.W. Anderson. R.S. Petrocelli y C.J. Gima, 1976b.** Osmorregulation of the grass shrimp *Palaeomonetes pugio* exponed to polychlorinated biphenyls (PCBS).II Effect of free amino acids of muscle tissue. *Marine Biology*, 38: 357-363.
- Roesijadi, G., 1992.** Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. Review. *Aquatic Toxicology*, 22:81-114.
- Rodriguez, E.M., J.M. Monserrat, y O.A. Amin, 1992.** Chronic toxicity of ethil parathion and isobutoxyetanol ester of 2,4-dichlorophenoxyacetic to estuarine juveniles and adults crabs. *Archivies Environmental Contamination and Toxicology*, 22:140-145.
- Rosenberg, R., y J.D. Costlow Jr. 1976.** Synergistics effects of cadmium and salinity combined whit constant and cycling temperatures on the larval development of two estuarine crab species. *Marine Biology*, 38:291-303.
- Sánchez, A.Z., 1979.** Efecto de la salinidad y temperatura sobre el balance hidrosalino de los peneidos de la Laguna de Mandinga, Veracruz. Tesis de Licenciatura en Biología. Fac. de ciencias. Univ. Nal. Auto. de México
- Sanders, J.G., R.W. Osman y G.F. Riedel, 1989.** Pathways of arsenic uptake and incorpotarion in estuarine phytoplankton and filter-feeding invertebrates *Eurytemora affinis*, *Balanus improvisus* and *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*, 103:319-385.
- Schreck, B.C., 1981.** Stress and compensation in teleost fishes: response to social an physical factors, p. 295-321. In: A.D. Pickering (Ed). Stress and Fish. Academic Press Inc. Ltd. London.
- Schreck, B.C., 1990.** Physiological, behavioral, and performance indicators of stress. *American Fisheries Society Symposium*, 8:29-37.
- Seitz, A., y H.T. Ratte, 1991.** Aquatic toxicology the problems of extrapolation from laboratory experiments with individuals and populations to communities effects in the field. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C:301-304.
- Shugart, L.R., J. Mc Carthy, B. Jimenez y J. Daniel, 1987.** Analysis of adduct foprmation in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) between benmzo(a)pyrene and DNA on the live and hemoglobin of the erythrocyte. *Aquatic Toxicology*, 9:319-325.

- Shugart, L.R., 1990.** DNA damage as an indicator of pollutant-induced genotoxicity, p. 348-355. *In:* W.G. Landis and W.H. Van Der Schaile (Eds). Aquatic Toxicology and Risk Assessment, Thirteenth volume. ASTM STP 1096. American Society of Testing and Materials, Philadelphia.
- Smith, J.R., 1985.** Copper exposure and ciliary function in gill tissue of *Mytilus californianus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 36: 556-563.
- Spence, S.K., G.W., Bryan. P.E., Gibbs, D. Masters, L. Morris, y S.J. Hawkins, 1990.** Effect of TBT contamination on Nucela populations. *Functional Ecology*, 4: 425-432.
- Stegeman, J.J., 1974.** Hydrocarbons in shieldfish chronically exposed to low levels of fuel oil, p. 329-347. *In:* F.J. Vernberg and W.B Vernberg (Eds). Pollution and Physiology of Marine Organisms. Academic Press Inc. New York.
- Struhsaker, J.W. y M.B. Eldridge, 1974.** Effects of benzene (a water-soluble component of crude oil) on eggs and larvae of Pacific herring and Northern anchovy, p. 253-284. *In:* F.J. Vernberg and W.B Vernberg (Eds). Pollution and Physiology of Marine Organisms. Academic Press Inc. New York.
- Thomas, P., 1990.** Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential in environmental monitoring. p. 9-28 *In:* S. M. Addams (Ed) Biological Indicators of Stress in Fish. American Fisheries Society Symposium, Bethesda, Maryland.
- Thompson, Jr. J.H., E.A. Skin., y T.J. Bright, 1980.** Effect of drilling muds on seven species of reef-building corals as measured in the field and laboratory, p. 433-453. *In:* R.A. Geyer (Ed). Environmental Pollution Hydrocarbons. Elsevier Oceanography Series. Scientific Publication Company, New York.
- Thurberg, F.P., M.A. Dawson, y R.S. Collier, 1973.** Effects of copper and cadmium on osmoregulation and oxygen consumption in two species of estuarine crabs. *Marine Biology*, 23: 171-175.
- Torreblanca, A., J. Díaz-Mayans, J. Del Ramo y A. Núñez, 1987.** Oxygen uptake and gill morphological alterations in *Procambarus clarkii* (Girard) after sublethal exposure to lead. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 26C: 219-224.
- Underwood, A.J. y C.H. Peterson, 1988.** Toward and ecological framework for investigation pollution. *Marine Ecology Progress Series*, 46: 227-234.
- UNEP/FAO/IAEA, 1986.** Test of the acute lethal toxicity of pollutants to marine fish and invertebrates. Reference Methods for Marine Pollution Studies. No. 43 (draft). UNEP. 23 P.
- Velduizen-Tsoerkn, M.B., D.A. Holuerda, C.V. y D.I. Zandee, 1990.** Effects of cadmium exposure and heat shock on protein synthesis in gill tissue of the sea mussel *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 96C: 419-426.
- Velduizen-Tsoerkn, M.B., D.A. Holuerda, C.V. y D.I. Zandee, 1991.** Synthesis of stress proteins on the normal and heat shock conditions in gill tissue of the sea mussel *Mytilus edulis* after chronic exposure to cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120C: 669-706
- Vernberg, W.B., P.J. DeCoursey y J. O'Hata, 1974.** Multiple environmental factor effects on physiology and behaviour on the fiddler crab *Uca pugilator*, p. 381-425. *In:* F.J. Vernberg and W.B Vernberg (Eds). Pollution and Physiology of Marine Organisms. Academic Press Inc. New York.
- Viarengo, A., G. Mancinelli, G. Martino, M. Pertica, L. Canesi y A. Mazzucotelli, 1988.** Integrated cellular stress indices in trace metal contamination: critical evaluation in a field study. *Marine Ecology Progress Series*, 46:65-70.
- Viarengo, A., L. Canesi, 1991.** Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture*, 94: 225-243.
- Viarengo, A., J.A. Nott, 1993.** Mechanism of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Mini-review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 104C: 355-372.
- Viarengo, A., L. Canesi, N.M. Moorey M Orunesu, 1994.** Effects of Hg²⁺ and Cu²⁺ on the cytosolic Ca²⁺ levels in molluscan blood cells evaluated by confocal microscopy and spectrofluorimetry. *Marine Biology*, 119: 557-564.
- Voogt, P.A., P.J. Den Besten, G. C.M. Kusters y M.W.J. Messing, 1987.** Effects of cadmium and zinc steroid metabolism and steroid level in the sea star *Asterias rubens* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 86C: 83-89.
- Vogt, G., y E. Quintio, 1994.** Accumulation and excretion of metal granules in the prawn *Penaeus monodon* exposed to water-borne copper, lead, iron and cadmium. *Aquatic Toxicology*, 28; 223-241.
- Waldichuck, M., 1974.** Some biological concerns in heavy metal pollution, p. 1-57. *In:* F.J. Vernberg and W.B Vernberg (Eds). Pollution and Physiology of Marine Organisms. Academic Press Inc. New York.

Wang S.Y., y W.B. Stickle, 1987. Bioenergetics, growth and molting of the blue crab *Callinectes sapidus* exposed to the water soluble fraction of South Louisiana crude oil, p. 107-126. In: W.B. Vernberg, A. Calabrese, F.P. Thurberg, and F.J. Vernberg (Eds). *Pollution Physiology of Estuarine Organisms*. University of South Carolina Press.

Wedemeyer, G.A., y D.J. McLeay, 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors, p. 247-275. In: A.D. Pickering (Ed). *Stress and Fish*. Academic press inc. (London) Ltd. London.

Widdows J., y D. Johnson, 1988, Physiologic energetics of *Mytilus edulis*. Scope for growth. *Marine Ecology Progress Series*, 46:113-121.

Widdows J., K.A. Burns., N.R. Menon, D.S. Page y S.Soria, 1990. Measurement of physiological energetics (scope for growth) and chemical contaminants in mussel (*Arca zebra*) transplanted along a contamination gradient in Bermuda. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 138: 99-117.

Widdows J., y P. Donkin, 1991. Role of physiological energetics in ecotoxicology. Mini review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C: 69-75.

Yáñez-Arancibia A., 1986. Ecología de la Zona Costera: Análisis de Siete Tópicos. AGT, editor, S.A. México, D.F. 189 p.

Zanders, P., y W. Rojas, 1992. Cadmium accumulation LC50 and oxygen consumption in the tropical marine amphipod *Elasmopus rapax*. *Marine Biology*, 113: 409-413.

Rendón von Osten, J., 2005. Uso de biomarcadores en ecosistemas acuáticos, p. 121-140. In: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 p.

Uso de Biomarcadores en Ecosistemas Acuáticos

Jaime Rendón von Osten

Universidad Autónoma de Campeche

5

RESUMEN

En este trabajo, se describe el empleo potencial de biomarcadores para caracterizar problemas de contaminación en las zonas costeras. Asimismo, se explican los mecanismos de operación de los principales biomarcadores como Citocromo P450, EROD, Glutación, Metalotioneinas, Colinesterasas y Transaminasas, haciéndose notar sus ventajas como una herramienta auxiliar en la diagnosis y efectos de los contaminantes que afectan a especies marinas ó estuarinas.

ABSTRACT

The potential use of biomarkers to define pollution issues in coastal zones, is fully described in this paper. Also, the different types and functions of the main biomarkers as Cytochrome P450, EROD, Glutation, Metalothioneins, Transaminases and Cholinesterase are explained, pointed out their advantages as a complimentary tool to characterize pollutants affecting the estuarine and marine species.

INTRODUCCIÓN

Existen múltiples factores estresantes en el ambiente los cuales pueden ser contaminantes, nutrientes, hipoxia, turbidez, sedimentos suspendidos así como habitats y regímenes hidrológicos alterados que pueden impactar a los recursos a través de procesos simples, tanto de manera acumulativa como sinérgica (Adams, 2005).

La complejidad de los ecosistemas acuáticos junto con su alta variabilidad inherente y la influencia de múltiples estresantes sugiere que, la medición de una sola o pocas variables, sea adecuada para estimar los efectos sobre la biota de múltiples factores con el fin de establecer las bases mecanísticas de estos efectos.

El uso únicamente de criterios para estimar los efectos de la calidad del agua sobre los ecosistemas puede ser un fundamento incompleto para cuestiones legales. Así, algunos criterios biológicos o biocriterios poseen algunos atributos deseables para estimar los efectos de factores ambientales y ayudar a entender las bases mecanísticas de estos efectos sobre el ecosistema. Algunos tipos de biocriterios, como los biomarcadores, no solo reflejan la exposición química, sino que tienen la capacidad de integrar muchos de los factores físicos, químicos y biológicos que operan en el sistema. Asimismo, muchos biocriterios tienen la capacidad de integrar los efectos de los estresantes sobre los organismos tanto espacialmente como temporalmente.

En la zona costera los organismos se encuentran expuestos a una mezcla compleja de sustancias químicas, por lo que los análisis químicos solo dan información de lo que uno esta determinando y, obviamente, esto es solo una pequeña parte de la gran complejidad de todos los compuestos químicos que existen en el ambiente.

Biomarcador

Los biomarcadores son respuestas o alteraciones bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e histopatológicas de los organismos ocasionadas por la exposición a contaminantes (US

NRC, 1989) y, en general, estas respuestas son rápidas, sensibles y, en ocasiones, reacciones específicas de los organismos a los contaminantes. Asimismo, se considera biomarcador a un cambio en la expresión genética que da lugar a una alteración en el contenido de proteína y actividad enzimática que se encuentra vinculado a la cantidad de contaminante (Bucheli y Fent, 1995).

En la figura 1 se observan tres categorías relacionadas con una estimación retrospectiva de riesgo con respecto a la dirección de la inferencia. Se identifica primero una fuente de contaminación de la cual se pretende determinar la naturaleza de los efectos, para lo cual, el vínculo entre la fuente y los efectos es la exposición. Así, en cada nivel de interacción desde la exposición a la manifestación del daño o la enfermedad se pueden identificar y cuantificar biomarcadores, tanto específicos como no-específicos, y obtener un amplio rango de posibles respuestas durante las diferentes fases, como se muestra en la figura 2.

Un biomarcador es útil para diseñar parámetros cuantitativos con la capacidad de dar información acerca de la exposición a xenobióticos, inducción de efectos por sustancias químicas sobre sistemas biológicos y la susceptibilidad del sistema a la exposición del tóxico. En la figura 2 se observa la intensidad de respuesta del biomarcador en cada etapa del desarrollo del daño, y B1 es el biomarcador que mejor respuesta o información brinda ya que esta se incrementa conforme se avanza en el estado de salud, de la homeostasis hasta la muerte. B3 da respuesta a partir de la compensación y hasta la muerte, sin embargo, la respuesta de no-compensación a muerte se mantiene uniforme, por lo que no es adecuado para diferenciar las etapas correspondientes. Los biomarcadores B2 y B4 responden solo a pequeños intervalos de la condición fisiológica, por lo que están limitados, en este caso, a los periodos de compensación y no-compensación reversible. B5 responde de manera intermitente, o sea, durante la compensación y posteriormente durante la no-compensación irreversible por lo que no es un biomarcador adecuado para evaluaciones de riesgo.

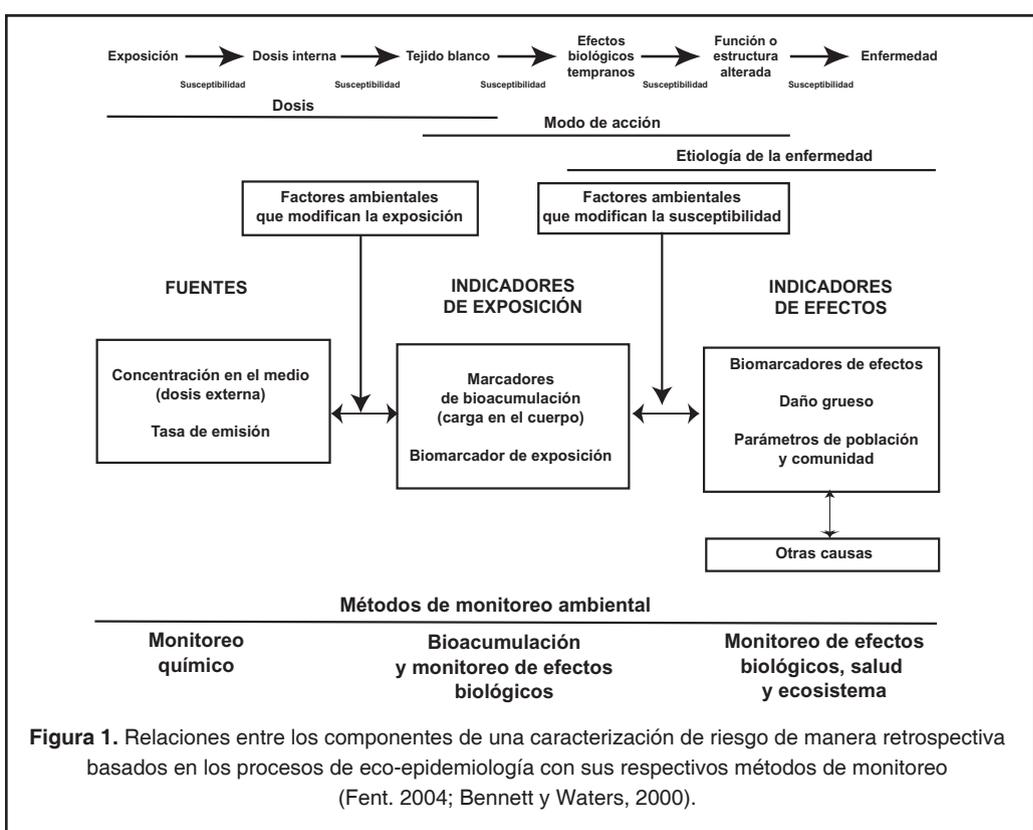


Figura 1. Relaciones entre los componentes de una caracterización de riesgo de manera retrospectiva basados en los procesos de eco-epidemiología con sus respectivos métodos de monitoreo (Fent. 2004; Bennett y Waters, 2000).

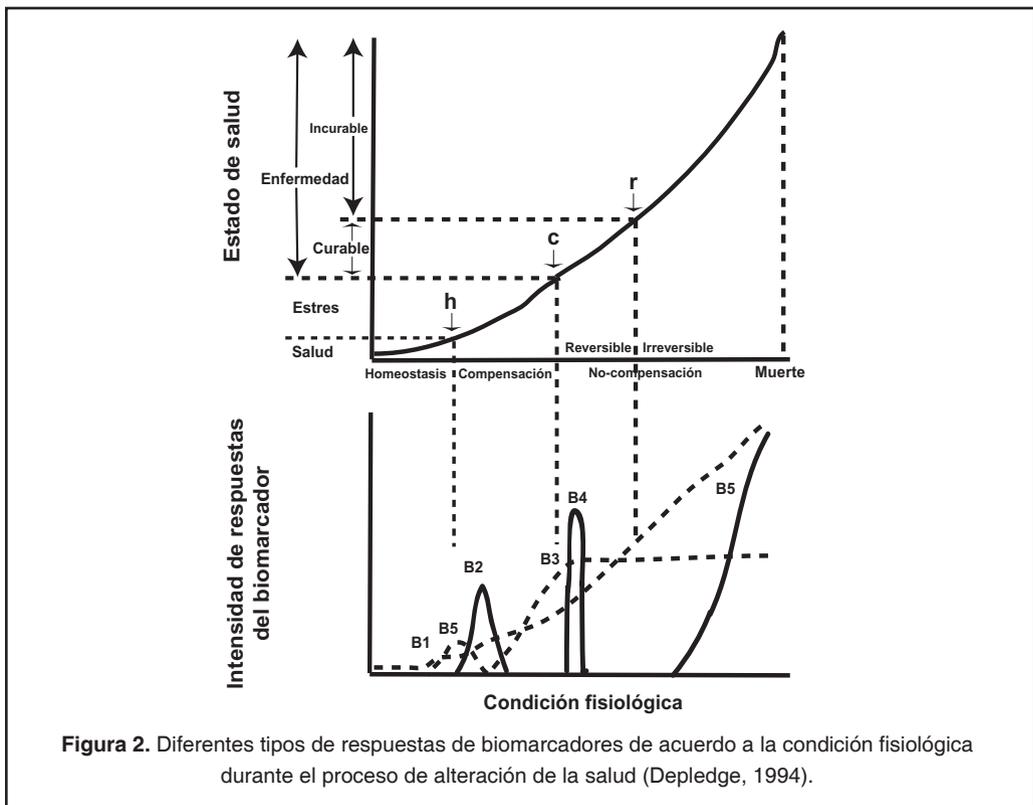


Figura 2. Diferentes tipos de respuestas de biomarcadores de acuerdo a la condición fisiológica durante el proceso de alteración de la salud (Depledge, 1994).

Validación y Características de los Biomarcadores

La validación es un proceso que se realiza para establecer la relación cualitativa y cuantitativa del biomarcador tanto a la exposición a la sustancia química como al indicador seleccionado. Los biomarcadores pueden ser evaluados y validados simultáneamente, tanto *in vitro* como *in vivo*. Uno de los principales objetivos de los biomarcadores es que puedan ser incorporados dentro de una evaluación de riesgo, por lo que se pretende que estos puedan ser aplicados en humanos y en organismos no-humanos.

Los biomarcadores deben ser validados antes de aplicarlos a la evaluación del riesgo, lo que significa que debe determinarse la relación entre el biomarcador, la exposición y el estado de salud. La selección, validación y empleo de cualquier biomarcador es un proceso complicado, y distinto para cada biomarcador.

Al establecer la relación causa-efecto o criterios causales se ha propuesto que los biomarcadores durante su validación presenten fuerte asociación con el xenobiótico, consistencia en la asociación, especificidad de la asociación, temporalidad definida, gradiente biológico amplio, evidencia experimental y que sean biológicamente aceptables.

Las características deseables de un bioindicador validado son (WHO, 2001):

- 1) Ser medible
- 2) Reflejar la interacción (cualitativa o cuantitativa) del organismo con la sustancia química de interés, y en el mejor de los casos, que sea específico y sensible
 - 2.1) Tener bases científicas, especificidad apropiada y sensibilidad a la interacción
 - 2.2) Ser reproducible cualitativamente y cuantitativamente con respecto al tiempo (corto y largo plazo)
 - 2.3) Presentar precisión y exactitud analítica en la medición

2.4) Conocer la cinética de formación del biomarcador al igual que su estabilidad

- 3) Ser común en individuos dentro de una población o subgrupo con variabilidad (estacional, temperatura, sexo, peso y manipulación) definida dentro de lo normal en poblaciones no expuestas
- 4) Ser común entre especies

El uso correcto de las respuestas biológicas como biomarcadores requiere un conocimiento de la variabilidad natural (Livingstone, 1993), cambios estacionales de factores bióticos y abióticos tales como metabolismo, estado nutricional, ciclo sexual, temperatura, entre otros. Lo anterior se realiza con el fin de establecer los niveles basales de cualquier biomarcador para relacionarlos posteriormente con una respuesta a los contaminantes (Collier *et al.* 1995; Eggens *et al.* 1996; Ronisz *et al.* 1999).

En general, hay tres clases de biomarcadores reconocidos (WHO, 1993):

- a) Biomarcador de exposición: medición de una sustancia exógena o su metabolito, o el producto de una interacción entre un xenobiótico y algunas moléculas o células blanco dentro de un organismo.
- b) Biomarcador de efecto: medición bioquímica, fisiológica, comportamiento u otra alteración dentro de un organismo que, dependiendo de la magnitud, puede ser reconocido y asociado con una enfermedad o alteración en la salud.
- c) Biomarcador de susceptibilidad: indicador de una capacidad adquirida o inherente de un organismo para responder a cambios de exposición a un xenobiótico específico.

Depledge (1994) describe un biomarcador adicional, biomarcador de efecto latente, el cual indica que aparentemente un organismo normal ha estado expuesto a un contaminante el cual, en otras circunstancias, puede limitar la capacidad de los organismos a adaptarse o a sobrevivir.

Por otra parte, de acuerdo a su especificidad los biomarcadores han sido clasificados como "Nivel I" y "Nivel II" (Sanders, 1990). Los biomarcadores de nivel I responden específicamente a un contaminante y, por lo general, implica la inhibición de enzimas. Por otra parte, los biomarcadores de nivel II responden a un estrés subletal general y, frecuentemente implica la activación o inducción de una enzima (Thompson y Grieg-Smith, 1991).

Además de elegir al biomarcador adecuado, en un programa de biomonitorio o vigilancia la selección de los organismos es una etapa importante, ya que el organismo puede presentar algunas ventajas y desventajas que pudieran no dar los resultados adecuados. Debido a lo anterior se sugiere que los organismos se-

leccionados estén considerados dentro de los organismos estandarizados por agencias internacionales, sin embargo, cuando se realizan estudios en campo es conveniente que se obtenga información de los organismos tanto en laboratorio (*in vivo*) como en campo (*in situ*). Lo anterior se puede lograr al realizar exposición de organismos en cámaras, al transplantar organismos y/o al mismo tiempo obtener información de los organismos autóctonos. De cualquier forma que se realice el trabajo, es preciso conocer la bioquímica y fisiología del organismo, establecer el tamaño y estado reproductivo, que sea de fácil muestreo, que esté disponible en número suficiente y edades, conocer su nivel trófico y, principalmente, que tenga importancia social y ecológica (Mayer *et al.*, 1992).

TIPOS DE BIOMARCADORES

Biotransformación Fase I

La primera fase del metabolismo de detoxificación implica procesos de oxidación, reducción e hidrólisis. La mayoría de las sustancias químicas son catalizadas por las enzimas microsomaes monooxigenasas (MO) o sistema de oxidasas de función múltiple (MFO) tales como el citocromo P450, citocromo b5 y citocromo P450 NADPH reductasa. En los peces, el citocromo P450 comprende una familia de hemo proteínas, que son proteínas que se encuentran enlazadas a la membrana localizadas principalmente en el retículo endoplásmico del hígado (Stegeman *et al.*, 1992), aunque también se encuentran en menor cantidad, en otros órganos y tejidos.

Citocromo Total P450 (cyt P450)

Aunque las proteínas del citocromo P450 no muestran respuesta a los contaminantes, la fuerte y selectiva inducción de algunas isoenzimas del P450 puede ocasionar una elevación de los niveles totales de citocromo P450, detectándose mediante la determinación de sus formas oxidadas y reducidas en el rango espectral de los 400 a 500 nm. Generalmente esta respuesta es menos sensible que esta en los niveles o actividades de isoenzimas

seleccionadas. Se ha observado que un solo compuesto puede inducir los niveles de isoenzimas, pero puede inhibir otras, lo cual puede resultar en una alteración considerable de niveles de isoenzimas mientras que la cantidad total de citocromo P450 no siempre es igualmente afectada

Se ha observado que el citocromo P450 juega un papel importante en el metabolismo oxidativo y de biotransformación de hidrocarburos aromáticos y clorados (Livingstone, 1993), aunque la ruta metabólica puede ser modulada significativamente por factores tales como temperatura, condición fisiológica y estado nutricional y reproductivo de el organismo (Collier *et al.*, 1995; Eggens *et al.*, 1996), la determinación del citocromo P450 es muy útil en programas de monitoreo. Por ejemplo, en la laguna Orbetello, al sureste de la costa de Tuscany, Italia, el índice somático del hígado y la actividad del P450 en el pez goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) fue dos veces más alta en peces colectados cerca de una planta de tratamiento que en los peces de la misma cuenca pero de sitios diferentes (Corsi *et al.*, 2003). Asimismo, se observó que la integración de las respuestas biológicas y las concentraciones de contaminación en los tejidos ayudó a distinguir las relaciones entre respuestas biológicas y carga de contaminantes.

Citocromo P450 1A (CYP1A)

La clase de isoenzimas del citocromo P450 responsable de la biotransformación de muchos compuestos orgánicos es la subfamilia CYP1A, la cual comprende dos genes, CYP1A1 y CYP1A2 (Goksøyr y Förlin, 1992). Los niveles de proteínas CYP1A pueden ser determinados inmunológicamente, y aunque el hígado es el órgano más importante, la expresión de CYP1A se ha observado en otros tejidos. La inducción de CYP1A1 en peces silvestres del río Willamette (Oregon, EUA), mostró una buena sensibilidad ya que, se encontró una respuesta del biomarcador hepático y concentraciones elevadas de TCDF en músculo de carpa (Curtis *et al.*, 1993).

En un transecto contaminado por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en la bahía de Galveston (Texas, EUA), con concentraciones de 68 to >1,000 ng g⁻¹ en sedimento, se observó una inducción en la actividad de la CYP1A1 en corvina (*Micropogon undulatus*), por lo que actualmente se considera la inducción de este biomarcador para programas de monitoreo (Willett *et al.*, 1997).

Etoxiresorfurin O-dietilasa (EROD) y Aril Hidroxilasa (AHH)

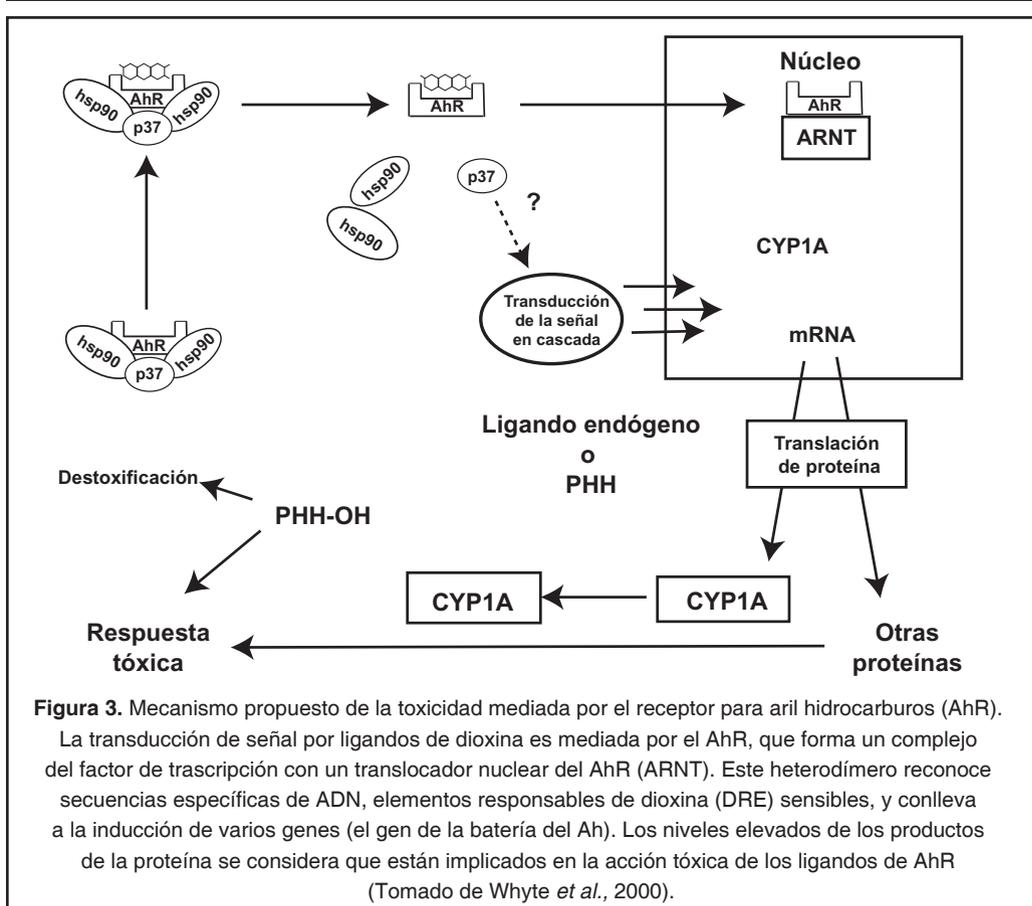
La determinación de la actividad de la etoxiresorfurin-O-dietilasa (EROD) en peces ha sido validada como un biomarcador por exposición a ciertos hidrocarburos halogenados planares (PHHs) y policíclicos aromáticos (HAPs), así como a otros compuestos estructuralmente similares.

El EROD es un biomarcador altamente sensible en peces expuestos a contaminantes, debido a que da evidencia de la inducción de citocromo P450 dependiente de mono-oxigenasas. Situado en el retículo endoplásmico liso, se metabolizan los compuestos exógenos y endógenos incrementando la solubilidad del compuesto para su eliminación. El citocromo P450 CYP1A tiende a detoxificar los compuestos químicos, sin embargo, por este mecanismo también se pueden tener compuestos más tóxicos que el compuesto original (Guengerich y Liebler, 1985).

La CYP1A tiende a incrementar la actividad en relación al incremento en la concentración del contaminante al cual se está expuesto. La inducción es mediada a través del enlace de xenobióticos al receptor aril hidrocarburo (AhR) citosólico (Fig. 3). Los ligandos AhR generalmente tienen configuraciones isotéricas y son similares en estructura a la 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina (2,3,7,8-TCDD), la cual es un inductor modelo de CYP1A. El enlace del receptor es seguido por una serie de eventos moleculares que conducen a la expresión de varios genes conocidos como "batería del gen-Ah" (Nebert *et al.*, 1993).

Los efectos tóxicos de los PHHs y de compuestos estructuralmente similares mediados por el AhR causan alteraciones en la homeostasis celular. Los peces, en los estadios tempranos parecen ser sensibles a los ligandos AhR, en donde están implicadas enzimas CYP1A que dan una respuesta tóxica (Mehrl *et al.*, 1988; Walker y Peterson, 1991). Existen factores internos, externos y temporales que pueden afectar la inducción de EROD en peces (Bucheli y Fent, 1995). Los factores biológicos que pueden influir en la actividad de la EROD incluyen especie, tamaño y edad del pez, así como estado reproductivo. Asimismo, el manejo de los peces en campo y laboratorio puede afectar las mediciones de EROD. La temperatura y pH pueden inducir a la EROD y debe ser rutinariamente medido a través del estudio.

Una variedad de sustancias químicas y mezclas de productos son conocidas por inhibir la inducción de EROD en peces. Estas sustancias pueden ser orgánicas, organometálicas y compuestos metálicos; como por ejemplo, los congéneros de policlorobifenilos (PCBs) y de compuestos organoestanosos. Asimismo, hay una compleja variedad de agonistas del AhR que son de naturaleza biogénica, incluyendo metabolitos de plantas y biotoxinas (Takahashi *et al.*, 1995). La presencia o ausencia de la actividad de la EROD en peces de un sitio, puede no siempre representar contaminación debido a agonistas de AhR, por lo que el diseño de estudios que incorporen una batería de respuestas biológicas a contaminantes producirá información más confiable.



La actividad de la EROD ha sido observada en varias especies de peces después de la exposición a residuos de contaminantes orgánicos. Es muy notorio que los HAPs, PCBs, PCDDs y PCDFs causan un fuerte incremento (>500% del control) en la actividad de la CYP1A. Por ejemplo, truchas arco iris juveniles (*Oncorhynchus mykiss*) y carpas (*Cyprinus carpio*) expuestas durante 16 días a los efluentes de una planta de tratamiento de aguas de desecho indujo fuertemente la actividad de la EROD comparados con el control (Kosmala *et al.*, 1998).

Por otra parte, en truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) mantenidas en estanques con llantas conteniendo aceite de hidrocarburos aromáticos, se observó un incremento en la actividad de la EROD y en los niveles de mRNA a partir del primer día de exposición y permaneció después de dos semanas (Stephensen *et al.*, 2003). En peces roca capturados en la Bahía del Príncipe William

y en el este del Golfo de Alaska se encontró una correlación positiva entre la actividad de la EROD con la relación fluoranteno+pireno/C24Fenantreno (FI+Py)/C24Ph (Page *et al.*, 2004).

Biotransformación Fase II

Glutación Reducida y Oxidada (GSH) y Glutación S-transferasa (GST)

Las reacciones de la fase II son biosintéticas, donde el xenobiotico o un metabolito derivado de la fase I es covalentemente enlazado a una molécula endógena. Hay varias reacciones posibles de la fase II, incluyendo la conjugación con el tripéptido glutatión (GSH). Las rutas de la fase II dependen primero de los xenobioticos y pueden ser diferentes entre especies (Sipes y Gandolfi, 1991).

La conjugación de glutatión implica la adición de GSH a un sitio electrofílico del sustrato y, la reacción es catalizada por la glutatión S-transferasa (GST; EC 2.5.1.18). La glutatión es una familia de enzimas que ha sido encontrada en todas las especies investigadas y presenta varias formas entre especies. Se ha observado que la actividad de la GST se induce en diferentes especies por contaminantes tales como metales (Ahner *et al.*, 2002), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) (An-Ping *et al.*, 2003), policlorobifenilos (PCBs) (Kamohara *et al.*, 1984) y plaguicidas (Forlin *et al.*, 1986; Almli *et al.*, 2002). Sin embargo, en otras especies los mismos compuestos pueden ocasionar una inhibición de esta enzima. Esto se puede deber a diferencias en las formas presentes en los diversos tejidos o entre especies. Aún con los factores de confusión mencionados, la GST ha sido usada como biomarcador de exposición a xenobióticos electrofílicos (Hodge *et al.*, 2000). Los sustratos para GST comparten tres características en común: pueden ser hidrofóbicos en algún grado, deben contener un átomo de carbono electrofílico y deben reaccionar no-enzimáticamente con la glutatión a una tasa medible (Sipes y Gandolfi, 1991). Las branquias o hígado son los tejidos más idóneos para la determinación de la GST.

UDP- Glucoronil Transferasa

La síntesis de glucuronidos mediante UDP glucoronil transferasas microsomales (UDPGTs) es la principal ruta para la inactivación y subsiguiente excreción tanto de compuestos endógenos como xenobióticos. La conjugación del ácido glucurónico (GA) requiere primero de la síntesis del ácido uridin 5'-difosfoglucurónico (UDPGA). El UDPGT cataliza la transferencia de UDPGA a una extensa variedad de sustratos receptores (aglicones) para formar O-, N-, S- y C- glucuronidos, la mayoría siendo O-glucuronidos (George, 1994). En los peces, el hígado es el sitio más importante para la glucuronidación de xenobióticos, sin embargo también se ha determinado en tejidos extrahepáticos, incluyendo riñón, branquias e intestino (George, 1994).

Aunque el sustrato receptor más utilizado es el 4-nitrofenol, se ha demostrado en peces que múltiples isoformas de UDPGT con subs-

tratos que difieren en especificidad. La isoforma UDPGT, la cual conjuga preferentemente fenoles planares, es inducida por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), probablemente por la vía de un mecanismo dependiente del receptor Ah (Nebert *et al.*, 1993; George, 1994). La actividad de la UDPGT en peces está influenciada por diferencias en el sexo, temporada, pH y temperatura.

Parámetros de Estrés Oxidativo

En situación normal, existe un balance entre la producción y eliminación de sustancias con oxígeno reactivo (ROS), y el estrés oxidativo se presenta cuando ocurre un desbalance. Los compuestos o especies de oxígeno reactivo son moléculas altamente reactivas las cuales interactúan con macromoléculas esenciales tales como DNA, proteínas y lípidos lo cual conduce a la alteración de procesos fisiológicos (Cnubben *et al.*, 2001). Entre las primeras enzimas que brindan una defensa contra el O_2^- y el H_2O_2 están la superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1), la catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) y la glutatión peroxidasa (GPx; EC 1.11.1.9).

Hay reportes acerca del éxito del empleo de estas enzimas en sistemas de biomonitorio (Fatima *et al.*, 2000; Sayeed *et al.*, 2003). En gran medida la peroxidación de lípidos está determinada por el balance entre la producción de oxidantes y la remoción de estos por parte de los antioxidantes. Por ejemplo, hay evidencia de que los plaguicidas organofosforados ejercen sus efectos tóxicos vía peroxidación de lípidos (Hai *et al.*, 1997; Hazarika *et al.*, 2003). Los peces son muy sensibles a estos contaminantes debido al metabolismo extrahepático y que implica efectos en la reproducción, función inmune y otras funciones celulares.

Se ha observado que el consumo alto de oxígeno en el músculo esquelético en relación con otros tejidos resulta en concentraciones altas de ROS. La branquia es el principal tejido osmoregulatorio en animales acuáticos y es el principal sitio de ingesta de contaminantes presentes en agua. Por lo tanto, la branquia es el primer sitio de efecto subletal de las sustancias (Evans, 1987; Sancho *et al.*, 1997), y el riñón recibe el "paquete" del flujo sanguíneo post

branquial, y estos tejidos son de importancia en la detoxificación y eliminación de contaminantes acuáticos en los peces.

Superoxido Dismutasa (SOD)

Las SODs son un grupo de metaloenzimas que catalizan la conversión del anión superóxido reactivo (O_2^-) para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual, por sí mismo es un importante compuesto con oxígeno reactivo (ROS). El H_2O_2 es subsecuentemente detoxificado por dos tipos de enzimas: catalasas (CAT) y glutatión peroxidasa (GPOXs). Las SODs se consideran que juegan un papel importante que radica por su presencia en todos los organismos aeróbicos estudiados. Asimismo, la tasa de SOD- catalizada por dismutación de O_2^- se aproxima al límite de difusión, haciéndola una de las enzimas más activas (Fridovich, 1986).

La determinación de la actividad de la SOD se realiza de manera indirecta en la cual hay una competencia del receptor *scavenger* ("limpiador") con la SOD endógena por O_2^- . Una unidad de actividad de la SOD se define como la cantidad que causa 50% de inhibición del "limpiador" bajo condiciones específicas. Se ha reportado un incremento en la actividad de SOD en peces expuestos a alimento contaminado con paraquat, 2,3,7,8-TCDF y HCB.

Se ha observado un incremento de la actividad de la SOD en 22% de los estudios llevados a cabo en laboratorio y de un 73% en los estudios en campo, mientras que no se observó fuertes incrementos (>500% del control) en cualquiera de los estudios de laboratorio o campo. Debido a la alta variabilidad de este biomarcador entre los estudios de campo y laboratorio, es necesaria una validación más precisa (van der Oost *et al.*, 2003).

Catalasa (CAT)

Las catalasas (CATs) son enzimas que contienen hematina que facilita la remoción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es metabolizado a oxígeno molecular (O_2) y agua. Las CATs solo reducen H_2O_2 , a diferencia de algunas peroxidasa que pueden reducir varios

peróxidos lipídicos (Stegeman *et al.*, 1992). Se ha demostrado que los compuestos que proliferan de los peroxisomas inducen la actividad de peróxido de hidrógeno que genera oxidasas de ácidos grasos y catalasa (CAT). Como las CATs están localizadas en los peroxisomas de muchas células y están implicadas en el metabolismo de ácidos grasos, los cambios observados en las actividades puede ser difícil de interpretar. La actividad de la CAT en los eritrocitos puede ser el marcador apropiado por exposición a oxidantes en vertebrados. Existen reportes que indican un incremento transitorio en la actividad de la CAT eritrocítica de carpas expuestas a paraquat (Stegeman *et al.*, 1992).

Un incremento en la actividad de la CAT hepática se ha observado en peces expuestos a sedimentos contaminados con PCBs o HAPs y, por otro lado, también se ha reportado una inhibición significativa de la actividad de la CAT con dinitro-*o*-cresol (DNOC) y 3,3',4,4'-TCB. Los peroxisomas tienen la capacidad de proliferar después de una exposición a xenobióticos, asimismo la inducción de la actividad de la enzima peroxisomal, especialmente las implicadas en la β -oxidación de ácidos grasos. Este tipo de respuesta se ha observado en animales expuestos a contaminantes tales como HAPs, PCBs, plastificantes, ácidos fenoxiacéticos, ácidos carboxílicos, tetrazoles, entre otros. La estructura de los peroxisomas de organismos procedentes de dos estuarios presentaron variaciones estacionales, por lo que es necesario tomar en consideración este tipo de alteraciones. Por otra parte, mejillones colectados en el estuario de Plentzia, España, respondieron a un incremento en la biodisponibilidad de contaminantes orgánicos durante el verano al aumentar los peroxisomas, así como la superficie y densidad en las células epiteliales digestivas (Orbea *et al.*, 1999).

Glutacion Peroxidasa (GPOX)

Las peroxidasa (POXs) son enzimas que reducen una variedad de peróxidos a sus correspondientes alcoholes. Mientras las CATs emplean una molécula de H_2O_2 como donador en la reducción de otra molécula de H_2O_2 , las peroxidasa emplean sus productos reducidos. La principal peroxidasa en los peces es una enzima citosólica tetramérica dependiente

del selenio que emplea GSH como cofactor. La GPOX cataliza el metabolismo del H_2O_2 a agua, implicando una oxidación de GSH reducido a su forma oxidada (GSSG). La GPOX se considera que juega un papel importante en la protección de las membranas al daño que pudiera ocasionar la peroxidación de lípidos (LPOX). Un incremento en la actividad de la GPOX ha sido observado en experimentos con peces expuestos a paraquat, HAPs, PCBs y HCB. Existen pocos experimentos, sin embargo se ha observado un incremento significativo en la actividad de la GPOX hepática de lisa (*Mugil sp.*) y pez cacho (*Leuciscus sp.*) de sitios contaminados. Por otra parte, un decremento significativo en la actividad de la GPOX se observó en trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) y lisa (*Mugil sp.*) expuestos en sitios contaminados. La respuesta en peces de la actividad de la GPOX en 14 estudios de laboratorio y 14 *in situ* indican que solo se observó un incremento significativo (>500% del control) en 43% de los estudios de laboratorio y en 14% de los de campo, y ninguno mostró baja en la actividad (van der Oost *et al.*, 2003).

Glutathion Reductasa (GRED)

La glutathion reductasa (GRED) es importante en el mantenimiento de la homeostasis de la GSH/GSSG bajo condiciones de estrés oxidativo. La GRED cataliza la transformación de la forma del disulfuro oxidado de la glutathion (GSSG) a la forma reducida (GSH), con la correspondiente oxidación de la NADPH a $NADPH^+$ (Winston y Di Giulio, 1991). Se ha observado un incremento en la actividad de la GRED en peces expuestos experimentalmente a PCBs, HAPs, DDE y HCB; sin embargo, una baja significativa en la actividad de la GRED se reportó para lisaa (*Mugil sp.*) expuestas a PCBs. De 11 estudios en laboratorio y 11 en campo, se observó una baja significativa en la actividad de la GRED en el 55% de los estudios de laboratorio y en el 18% de los de campo, mientras que un fuerte incremento (>500% del control) solo se observó experimentalmente en trucha arcoiris expuesta a PCBs (Otto y Moon, 1995).

Proteínas de Estrés y Metalotioneinas

Proteínas de Estrés (HSPs)

Las proteínas de estrés (HSPs) comprenden un conjunto de proteínas abundantes las cuales están involucradas en la protección y reparación de la célula en respuesta al estrés y condiciones de alteración, incluyendo temperatura alta o baja, luz ultravioleta, condiciones oxidativas, anoxia, estrés salino, metales pesados y xenobióticos tales como teratógenos y hepatocarcinógenos (Stegeman *et al.*, 1992; Di Giulio *et al.*, 1995). Las proteínas de estrés son parte de la estrategia de la célula para protegerse por si misma de algún daño. Existen dos tipos de respuesta estrechamente relacionados con grupos de productos génicos: el grupo de HSPs y el grupo de proteínas reguladas por glucosa (GRP). El grupo HSPs se incrementa drásticamente debido a la exposición a estrés de calor y a estrés físico y químico, y la síntesis de GRP se incrementa en las células por factores tales como la privación de glucosa u oxígeno (Stegeman *et al.*, 1992). En condiciones experimentales se observó la síntesis de proteína de estrés (HSP70) en peces (*Aphanius iberus*) que fueron alimentados con *Artemia franciscana* y *A. partenogenética* contaminada con clorpirifos (Varo *et al.*, 2002).

Metalotioneinas (MTs)

Las metalotioneinas (MTs) constituyen una familia de proteínas de peso molecular bajo, ricas en cisteína que funcionan en la regulación de metales esenciales como Cu y Zn, y en la destoxificación de estos y otros metales no esenciales como el Cd y el Hg (Thomas, 1990). En las interacciones celulares que involucran MTs se espera sigan dos líneas generales, la primera es la intercepción y enlace de iones metálicos, los cuales son inicialmente tomados por la célula y, la segunda siendo la remoción de metales de ligandos no-tionein, que incluye blancos celulares de toxicidad. Esta última puede representar una función de destoxificación para ciertas estructuras, las cuales han sido dañados reversiblemente por enlaces metálicos inapropiados. El papel de las MTs en secuestrar metales está bien establecida,

mientras que su inducción por exposición a una extensa variedad de metales (Cd, Cu, Zn, Hg, Co, Ni, Bi y Ag) está asociada con su función protectora (Stegeman *et al.*, 1992). La capacidad de inducción de MTs es mayor en tejidos activos en la ingesta, almacenaje y excreción, tales como intestino delgado, hígado y branquias de los peces (van der Oost *et al.*, 2003). En un estudio en campo con peces *Scorpaena porcus* capturados en sitios contaminados y no contaminados, se observó una inducción de MTs en hígado y branquias relacionadas con altas concentraciones de Cd y Cu en los peces del sitio contaminado (Hamza-Chaffai *et al.*, 1997).

Parámetros Inmunológicos

Transaminasas

Las transaminasas, transaminasa alanina (ALT o GPT) y la transaminasa aspartato (AST o GOT) constituyen un grupo de enzimas que cataliza la interconversión de amino ácidos y acetocidos por transferencias de grupos amino. El complejo α -cetoglutarato/L-glutamato funciona como un grupo amino receptor y donador en reacciones de amino transferencia. La ALT cataliza la transferencia del grupo amino alanina a la α -cetoglutarato para formar glutamato y piruvato, mientras que AST cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato a α -cetoglutarato para formar glutamato y oxaloacetato. Un incremento en la actividad enzimática en el fluido extracelular o plasma es un indicador sensible aun a un pequeño daño celular ya que los niveles de estas enzimas dentro de las células exceden a estas en los fluidos extracelulares en más de tres órdenes de magnitud. Los niveles de AST y de ALT se incrementan conforme a los procesos de alteración en la integridad celular del hígado, aunque ALT es una enzima más específica para hígado. Debido a que AST y ALT en peces no ha sido muy estudiada se sugiere como alternativa de biomarcador de daño en tejidos a la GSTs (van der Oost *et al.*, 2003).

Parámetros Reproductivos y Endocrinos

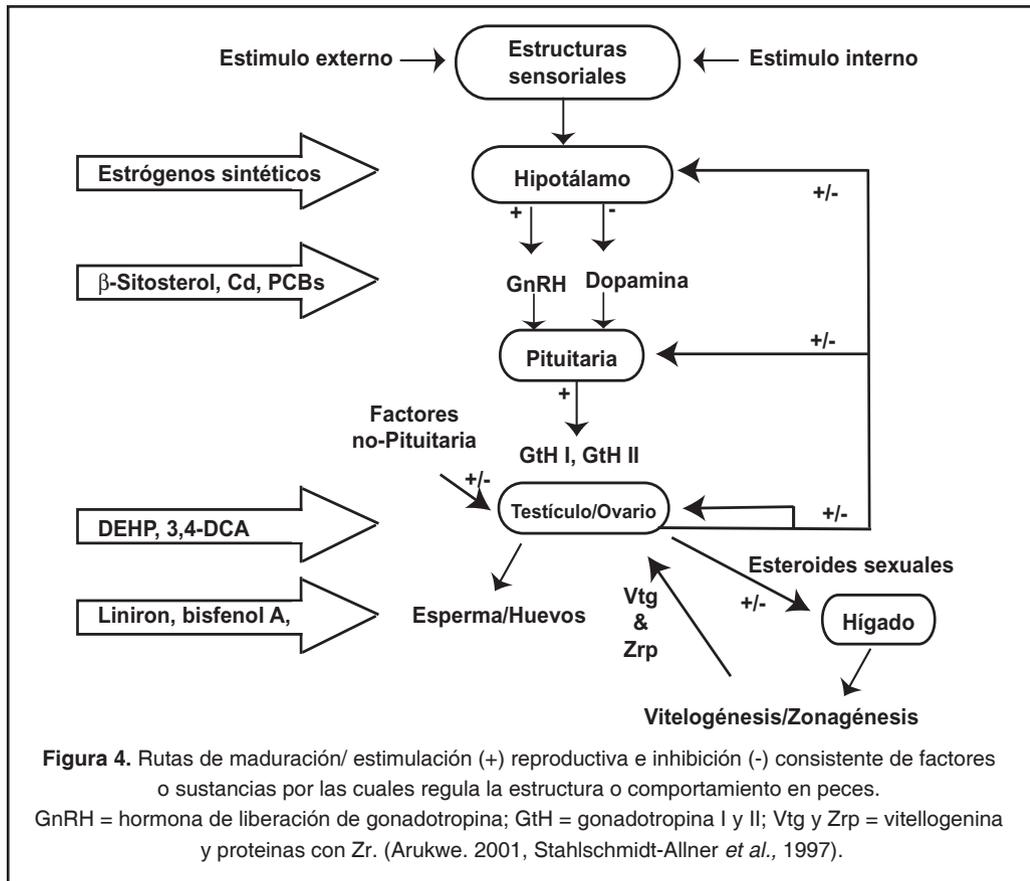
Un disruptor endocrino es una sustancia o mezcla de ellas que altera la función del sistema endocrino y causa efectos adversos en la salud de un organismo, o en su progenie o a nivel de sub-poblaciones (WHO, 2001).

El modo de acción de los moduladores o disruptores endocrinos no está bien establecido, y se han propuestos varios mecanismos por los cuales algunos compuestos con efectos endocrinos son capaces de disruptir o alterar funciones vitales del sistema endocrino ya que:

- 1) Pueden ser estructuralmente similares a las hormonas a las cuales son capaces de enlazarse a receptores celulares diseñados para ser el "blanco" para las hormonas naturales, lo cual causa actividad celular anormal e impredecible.
- 2) Pueden bloquear los sitios de enlace, así que las hormonas naturales son incapaces de enlazarse a ellos, con la consecuente alteración en la actividad celular.
- 3) Pueden inducir la creación extra de sitios receptores en la célula, con la consecuente amplificación del impacto de las hormonas sobre la actividad celular.
- 4) Pueden interactuar directa o indirectamente con hormonas naturales, cambiando el mensaje de la hormona y alterando la actividad celular.
- 5) Pueden alterar el patrón natural de la síntesis hormonal y metabolismo, lo cual resulta en una alteración en el balance o cantidad de hormonas que circulan.

En la figura 4 se muestra la estructura jerárquica del sistema endocrino así como los compuestos químicos que pueden interferir con este sistema.

El estímulo exógeno, como la luz del día, feromonas y comportamiento con específico, se



conoce como “reloj interno”. La principal función del sistema endocrino es transformar varios estímulos exógenos en mensajes químicos, las hormonas. En este proceso se incluye una cadena de eventos que resultan en la expresión del gen apropiado o en la activación de un sistema enzimático específico de un tejido a través del mecanismo de la adenilato ciclasa. Los procesos controlados por hormonas generalmente son a largo plazo, prolongados y frecuentemente irreversibles, como por ejemplo la metamorfosis o la diferenciación sexual. Es importante mencionar que las hormonas tienen muy bajas concentraciones efectivas, por lo que, cualquier alteración en su concentración o la presencia de “imitadores” aún a muy bajas concentraciones pueden tener efectos adversos muy graves (Stahlschmidt-Allner *et al.*, 1997).

Vitelogenina

La vitelogenina (Vtg) es una proteína producida por los peces hembra que es precursora de las

proteínas de reserva del huevo. Su expresión se encuentra bajo el control del estradiol (E[2]) de origen ovárico. Por este motivo las perturbaciones en su expresión se utilizan como indicadores de disrupción endocrina producida por contaminantes estrogénicos o xenoestrógenos (tales como plaguicidas, así como desechos de origen industrial y urbano). En peces teleósteos, el E[2] está asociado a distintos eventos fisiológicos: vitelogénesis, comportamiento y diferenciación sexual. Muchas funciones cerebrales como la proliferación, morfología, supervivencia y sinaptogénesis neuronal dependen de la síntesis local de E[2] a partir de testosterona por la aromatasa (P450arom). La aromatasa ha sido identificada en varios tejidos, principalmente en cerebro de peces en donde se han descrito dos variantes: aromatasa gonadal (P450aromA) y cerebral (P450aromB) (Schwaiger y Negele, 1998).

En ciprinidos las concentraciones de Vtg en hembras maduras se encuentran entre algunos cientos y hasta miles de $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las concentraciones en hembras inmaduras fueron siem-

pre mayores a 200 ng mL^{-1} , mientras que en machos las concentraciones de Vtg en plasma fueron menores de 20 ng mL^{-1} (Tyler *et al.*, 1996). En un estudio con salmón del atlántico (*Salmo salar*) expuesto a 4-nonilfenol y a efluentes de una planta de tratamientos de una refinería se encontró una inducción de la Vtg y de proteínas de la zona radiata (Zrp) relacionadas con la dosis (Arukwe *et al.*, 1997).

Parámetros Neurotóxicos

Colinesterasa

La actividad de la colinesterasa (ChE) ha sido extensamente usada para estimar la exposición a plaguicidas organofosforados (OFs) y carbámicos (CBs) tanto en humanos como en vida silvestre. Las colinesterasa pertenece a una familia de esterasas las cuales fueron clasificadas por Aldridge (1953) en tres clases: esterasas A, B y C basadas en su comportamiento hacia los compuestos OFs. Las esterasas A hidrolizan a los oxones y otros triésteres OFs. Las esterasas B son un gran grupo de serina hidrolasas las cuales son inhibidas por los OFs, e incluye el grupo de las colinesterasas. Las C esterasas no interactúan con los OFs.

Las colinesterasas se dividen en acetilcolinesterasa (AChE; EC 3.1.1.7) y butirilcolinesterasa (BChE; EC 3.1.1.8). La AChE es la responsable del rompimiento del neurotransmisor acetilcolina dentro de la sinapsis colinérgica durante la transmisión del impulso nervioso. La inhibición de esta enzima resulta en la acumulación del neurotransmisor en la abertura sináptica originando una estimulación continua de los receptores localizados en la membrana post-sináptica que puede conducir a la muerte generalmente debido a fallo respiratorio (WHO, 1986). La AChE se encuentra principalmente en el tejido nervioso en las uniones neuro musculares, en los eritrocitos y en el plasma de algunos vertebrados. La BChE es una esterasa relativamente no específica la cual hidroliza un número de esteres de colina incluyendo a la acetilcolina, la cual se encuentra en el hígado, suero y músculo (WHO, 1986). Su papel fisiológico no ha sido bien establecido. Esta enzima hidroliza algunos compuestos xenobióticos y enlaza a OFs y CBs, por lo que algunos autores

sugieren un papel de la AChE relacionado con la protección (Thompson, 1999). Muchos compuestos OFs no son inhibidores directos de la ChE y necesitan ser activados a su correspondiente oxón para ejercer su actividad.

El proceso para formar el oxón se lleva a cabo por las monooxigenasas del citocromo P450, principalmente en el hígado, aunque también puede realizarse en otros tejidos. El átomo de fósforo del oxón reacciona con el sitio activo serina de la enzima, actuando como un substrato "suicida", y debido a que la reactivación de la enzima fosforilada es muy lenta, esta se considera como una reacción irreversible desde el punto de vista fisiológico. La inhibición de la AChE por OFs ocurre a muy bajas concentraciones (típicamente las I_{50} son de 10^{-8} - 10^{-10} M). En el caso de los CBs la carbamización de la enzima es una reacción inestable y la enzima es liberada en un periodo corto y de forma espontánea (Thompson, 1999). La determinación de la actividad de la colinesterasa en organismos acuáticos ha sido muy empleada desde hace varios años (Kozlovskaya *et al.*, 1993).

En peces expuestos a plaguicidas organofosforados y carbámicos se ha observado la inhibición de la acetilcolinesterasa de músculo más que en cerebro, lo cual puede ser un efecto protector del organismo. Este fenómeno se ha observado en peces (*Carassius auratus*) expuestos a 0.5 mg L^{-1} de carbofuran (Bretaud *et al.*, 2000), así como en gambusias (*Gambusia affinis*) expuestas a clorpirifos (Carr *et al.*, 1997).

Parámetros Genotóxicos

Existen varios parámetros genotóxicos que pueden ser evaluados en organismos acuáticos tomando en cuenta biomarcadores citogenéticos siendo los más importantes la determinación del gen p53 como biomarcador de mutación en el ambiente acuático (Bhaskaran *et al.*, 1999), asimismo la cuantificación de aberraciones cromosómicas, el intercambio de cromátidas hermanas y la determinación de micronúcleos (MNs), han sido los métodos más utilizados en organismos acuáticos debido a su relativa fácil determinación y sensibilidad a la exposición a sustancias genotóxicas (Tucker y Preston, 1996).

Micronúcleos (MN)

Los micronúcleos (MNs) son cromosomas completos o fragmentos cromosómicos que se condensan y permanecen rezagados durante la anafase del ciclo celular. Se han propuesto cuatro mecanismos (fragmentos acéntricos, cromosomas multicéntricos, daño al cinetócoro y daño al huso) para la formación de MNs que involucran clastogenicidad (rompimiento del ADN) o aneuploidia (Müller y Streffer, 1994). El ensayo de MN en peces tiene el potencial de detectar agentes clastogénicos en el medio acuoso (Al-Sabti *et al.*, 1994).

Los micronúcleos se constituyen de una pequeña masa nuclear delimitada por membrana y separada del núcleo principal. Los micronúcleos son formados durante la telofase de la mitosis o meiosis, cuando la cubierta nuclear es reconstituída alrededor de los cromosomas de las células hijas. Son resultado de fragmentos cromosómicos acéntricos o de cromosomas enteros que no fueron incluidos en el núcleo principal. El micronúcleo representa la pérdida de cromatina en consecuencia del daño cromosómico estructural o daño del aparato mitótico. Es importante resaltar que los MNs son formados durante la mitosis, independientemente del tipo de daño ocurrido durante el ciclo. Por eso, los daños causados en el ADN, por ejemplo, en la exposición a agentes mutagénicos solamente se expresan en micronúcleos después de un ciclo de división celular, siendo dependientes de la proporción de células que se están dividiendo. Consecuentemente, la comparación de frecuencias de micronúcleos entre poblaciones de células en división solo sería segura cuando la cinética de división nuclear o daño al DNA fuera idéntica (Fenech, 1997).

La determinación de micronúcleos con citocalasina (MNCtB) puede ser usado para el biomonitoreo de compuestos con efectos genotóxicos, con el fin de evaluar el potencial mutagénico de agentes químicos y físicos y para estudios específicos como variación interindividual (Buschini *et al.*, 2004; Porto *et al.*, 2005).

Enzimas de Metabolismo

Una enzima que ha sido usada como biomarcador es la lactato deshidrogenasa (LDH; EC

1.1.1.28). La LDH son enzimas citoplasmáticas las cuales catalizan la reducción reversible de piruvato a lactato. Las LDH son importantes en procesos energéticos en muchos grupos de animales (Vassault, 1983). La lactato ha sido usado como parámetro en bioquímica clínica como indicador de daño de tejido y órganos. Cuando se presenta ruptura de la membrana celular, la LDH se libera de la célula al espacio extracelular y eventualmente se libera a la sangre (Clarke, 2002), por lo que el incremento de esta enzima en el plasma se considera como biomarcador de daño tisular.

El uso de LDH como biomarcador se basa en el supuesto de que los organismos bajo estrés químico generalmente necesitan obtener energía adicional de una manera rápida, incrementado para esto el uso de la glicólisis anaerobia. La respuesta de la LDH parece depender del tiempo de exposición y puede tener variaciones con relación a la sustancia y el organismo, debido a factores de confusión. Por ejemplo, se ha observado una baja significativa de la LDH en peces expuestos a carbofuran, carbaryl, DDT, hexacloro benceno (BHC), diclorvos (DDVP) y monocrotofos (Singh y Sharma, 1998; Sharma y Gopal, 1995). Asimismo, una baja en la actividad de la LDH se determinó 10 días después de la exposición a concentraciones subletales de clorpirifos, endosulfan y furadan (Radhakrishnaiah y Renukadevi, 1989). Por otra parte, Gill *et al.* (1990) reportaron un incremento de la LDH en branquias, músculo esquelético y corazón del pez *Puntius conchonius* después de una exposición a aldicarb, sin embargo, en el mismo experimento, se observó una inhibición de la LDH en hígado.

Otros Biomarcadores

Como se mencionó anteriormente, existen varios biomarcadores empleados en programas de monitoreo que están validados y otros más que se encuentran en validación, como por ejemplo, se ha observado que los peces tienen la capacidad de desarrollar nuevos nefrones seguido de un daño renal que pudiera estar asociado a un contaminante o xenobiotico. En un estudio llevado a cabo con peces de varios ríos de Estados Unidos se observó un elevado desarrollo de nefrones en peces procedentes de sitios contaminados en relación a los menos

contaminados. El desarrollo de nefrones tiene el potencial de ser usados como biomarcadores para la detección de compuestos nefrotóxicos en sitios específicos (Cormier *et al.*, 1995).

Durante los últimos años se han desarrollado una variedad de alteraciones histopatológicas que han sido usados como biomarcadores en programas de biomonitorio. En la tabla 1 se muestran los biomarcadores histo-citologicos que se determinan en los peces y los cuales están relacionados con la calidad ambiental y principalmente a la presencia de contaminantes químicos.

De manera general se puede decir que la aproximación histopatológica se considera como biomarcador de nivel II, ya que la especificidad de este no es muy alta, por ejemplo, el hígado juega un papel importante en las respuestas toxicológicas ya que los xenobióticos inducen a cambios patológicos que pueden ser observados a nivel histológico del hígado (Hinton y Lauren, 1990). La desventaja es que frecuentemente en histopatología es difícil cuantificar las respuestas, por lo que se recomienda realizar un batería de biomarcadores

Tabla 1. Biomarcadores histo-citologicos y sus tipos de contaminación/estrés (Au, 2004; Pawert *et al.*, 1998).

Biomarcador Histo-citológico	Indicativo de
Erosión en la aleta	Condición general de la salud del pez (estrés indirecto y sustancias toxicas en el agua)
Malformación de esqueleto	Condición general de la salud del pez e hidrocarburos clorados
Hiperplasia epidérmica	Condición general de la salud del pez relacionada a tóxicos y estrés ambiental
Anormalidades opérculo	Condición general de la salud del pez y efluentes de papeleras
Histopatología del hígado	Condición general de la salud del pez y niveles de tóxicos, carcinógenos y contaminantes urbanos
Histopatología de branquias	Stress general a metales, petróleo, contaminantes orgánicos, algas tóxicas y sólidos suspendidos
Histopatología de riñón	Condición general de la salud del pez y contaminantes orgánicos tóxicos
Agregados de macrófagos	Química general y estrés físico
Defectos embríonicos	Contaminantes orgánicos
Histopatología de bivalvos	Contaminantes orgánicos, plaguicidas y petróleo
Integridad de lisosomas	Estrés general en células, respuesta a gran variedad de contaminantes
Contenido lipopigmentoso	Estrés oxidativo causado por PAHs y petróleo
Proliferación de peroxisoma	Stress oxidativo causado por PAHs y petróleo

CONCLUSIONES

La utilidad de cada uno de los biomarcadores dependerá de sus ventajas y desventajas así como de la relevancia ecológica, sensibilidad, especificidad, dificultades técnicas y costos.

La estimación de exposición a los contaminantes y sus efectos posee incertidumbre, ya que los efectos adversos dependerán de la

magnitud y duración de la exposición, el modo de acción de la sustancia tóxica, el lapso requerido para manifestarse el estado de enfermedad y la susceptibilidad de los organismos. La variabilidad inherente entre los individuos por razones geográficas, genéticas y alteraciones naturales, por lo general, hacen difícil demostrar la alteración toxica.

Es importante señalar que, debido a la complejidad de los ecosistemas y a la presencia de múltiples contaminantes en condiciones reales, no existe un biomarcador que pueda dar información completa acerca de la calidad ambiental. Debido a lo anterior y aunque exista limitación en el material biológico disponible, se recomienda llevar a cabo una batería de biomarcadores que integre la respuesta de estos con el fin de detectar alteraciones ambientales aplicando a los resultados métodos multivariados (WHO, 2001; Beliaeff y Burgeot, 2002). En la figura 5 se muestran solo algunos de los posibles biomarcadores que pueden evaluarse en los organismos acuáticos.

Los biomarcadores específicos varían de acuerdo a la especie, sexo, época climática, temperatura, dieta, presencia de compuestos sinérgicos o antagonísticos, por lo que la selección del organismo apropiado, tejidos y biomarcadores para especies particulares en ecosistemas particulares puede minimizar los efectos o factores de confusión.

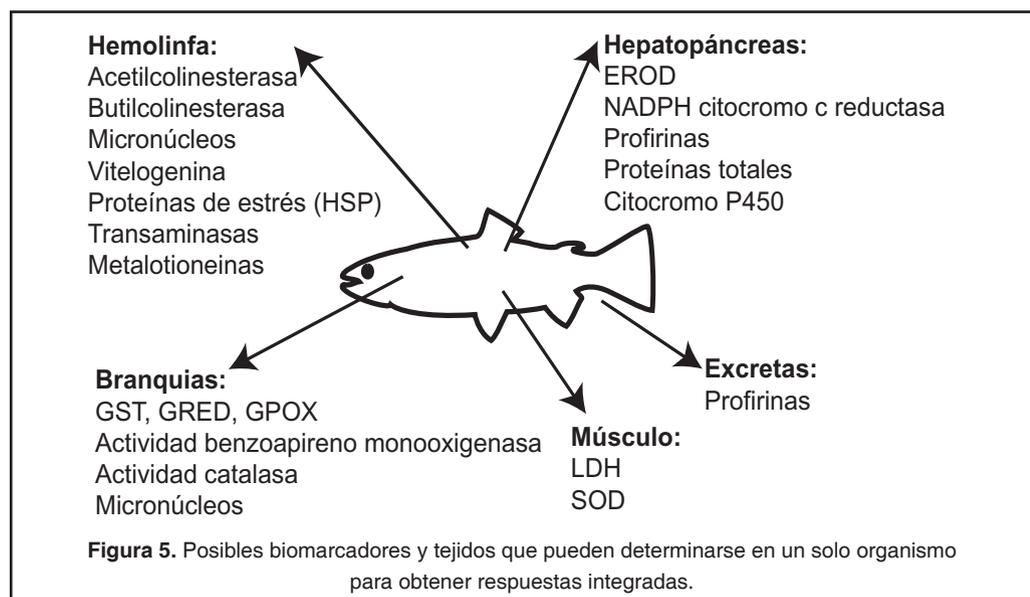
Aunque existen varios biomarcadores potenciales, es necesario realizar estudios sobre su validación y, lo más importante, incorporar a los biomarcadores validados en el proceso de evaluación de riesgos.

El uso de biomarcadores en el diagnóstico de alteración de los ecosistemas y la exposición

de la vida silvestre a xenobióticos tiene varias ventajas: a) la respuesta de los biomarcadores puede indicar la presencia de contaminantes biológicamente disponibles, b) con un conjunto o batería de biomarcadores adecuados se puede dilucidar la presencia de contaminantes que no habían sido considerados, c) los biomarcadores pueden detectar eventos de contaminación intermitente e integrar en tiempo y espacio la exposición, y d) los biomarcadores son capaces de detectar efectos inducidos por mezclas complejas de contaminantes. En muchas ocasiones los biomarcadores son mucho más fáciles y económicos de determinar que otras opciones, como lo son los análisis químicos (Handy *et al.*, 2003).

La validación de biomarcadores para fines de investigación y de evaluación de riesgos requiere la realización de estudios tanto de laboratorio como eco-epidemiológicos o de campo.

Los biomarcadores validados deben ser empleados como instrumentos de evaluación de los riesgos, ya que los biomarcadores permitirán realizar evaluaciones de riesgos biológicamente fundamentadas, con lo cual se podrán realizar estudios prospectivos para establecer la relación entre los biomarcadores y los riesgos de enfermedad o de alteración en la salud ambiental.



LITERATURA CITADA

- Adams, S.M., 2005.** Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems. *Marine Pollution Bulletin*. In press. Disponible en línea doi:10.1016/j.marpolbul.2004.11.040
- Ahner, B.E., L. Wei, J. R. Oleson, y N. Ogura, 2002.** Glutathione and other low molecular weight thiols in marine phytoplankton under metal stress. *Marine Ecology Progress Series*, 232:93-103.
- Aldridge, W.N., 1953.** Serum esterases. *Biochemistry Journal*, 53:110-117.
- Almli, B., E. Egaas, A. Christiansen, O.M. Eklo, O. Lode, y T. Kaellqvist, 2002.** Effects of three fungicides alone and in combination on glutathione S-transferase activity (GST) and cytochrome P-450 (CYP 1A1) in the liver and gill of brown trout (*Salmo trutta*). *Marine Environmental Research*, 54(3-5):237-240.
- Al-Sabti, K., M. Franko, B. Andrijani, S. Knez, y P. Stegnar, 1994.** Chromium induced micronuclei in fish. *J. Appl. Toxicol.*, 13:333-336.
- An-Ping, L., W. Yuk-Shan, y T. Nora Fung-Yee, 2003.** Pyrene-induced changes of glutathione-S-transferase activities in different microalgal species. *Chemosphere*, 50(3):293-301.
- Arukwe A., 2001.** Cellular and molecular responses to endocrine-modulators and the impact on fish reproduction. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8):643-655 .
- Arukwe, A., F.R. Knudsen, y A. Goksoyr, 1997.** Fish zona radiata (eggshell) protein: A sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environmental Health Perspectives*, 105(4):418-422.
- Au, D.W.T., 2004.** The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 48:817-834.
- Beliaeff, B., y T. Burgeot, 2002.** Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 1316-1322.
- Bennett, D.A., y M.D. Waters, 2000.** Applying biomarker research. *Environmental Health Perspectives*, 108(9): 907-910.
- Bhaskaran, A., D. May, M. Rand-Weaver, y C.R. Tyler, 1999.** Fish p53 as a possible biomarker for genotoxins in the aquatic environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 33(3):177-184.
- Brethead, S., J.P. Toutant, y P. Saglio, 2000.** Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotox. and Environ. Safety*, (47)117-124.
- Bucheli, T. D., y K. Fent, 1995.** Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 25(3)201-268.
- Buschini, A., A. Martino, B. Gustavino, M. Monfrinotti, P. Poli, C. Rossi, M. Santoro, A.J.M. Dorr, y M. Rizzoni, 2004.** Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutag.*, 557(2):119-129.
- Carr, R.L., L.L. Ho, y J.E. Chambers, 1997.** Selective toxicity of chlorpyrifos to several species of fish during an environmental exposure: biochemical mechanisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 2369-2374.
- Clarke, JTR., 2002.** Clinical Guide to Inherited Metabolic Diseases. 2nd Edition. Port Chester, NY. USA. Cambridge University Press.
- Cnubben N.H.P., I.M.C.M. Rietjens, H. Wortelboer, J. van Zenden, y P.J. van Bladeren, 2001.** The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defence. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 10:141-152.
- Collier, TK, B.F. Anulacion, J.E. Stein, A. Goksoyr, y U. Varanasi, 1995.** A field evaluation of cytochrome P4501A as a biomarker of contaminant exposure in three species of flat-fish. *Environ Toxicol Chem* 14: 143-152
- Cormier, S.M., T.W. Neiheisel, P. Wernsing, R.N. Racine, y R. Reimschuessel, 1995.** New nephron development in fish from polluted waters: A possible biomarker. *Ecotoxicology*, 4(3):157-168.
- Corsi I., M. Mariottini, C. Sensini, L. Lancini, y S. Focardi, 2003.** Fish as bioindicators of brackish ecosystem health: integrating biomarker responses and target pollutant concentrations. *Oceanologica Acta*, 26(1): 129-138.

- Curtis, L.R., H.M. Carpenter, R.M. Donohoe, D.E. Williams, O.R. Hedstrom, M.L. Deinzer, M.A. Beilstein, E. Foster, y R. Gates, 1993.** Sensitivity of cytochrome P450-1A1 induction in fish as a biomarker for distribution of TCDD and TCDF in the Willamette River, Oregon. *Environmental Science & Technology*, 27(10): 2149-2157.
- Depledge M., 1994.** The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: M.C. Fossi y C. Leonzio (Eds). *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publisher, USA.
- Di Giulio, R.T., W.H. Benson, B.M. Sanders, y P.A. van Veld, 1995.** Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity, P. 523-562. In: G.M. Rand, G.M. (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental fate, and Risk Assessment*, Second ed.. Taylor and Francis, London, UK,
- Eggens, M.L., A. Opperhuizer, y J..P. Boon, 1996.** Temporal variation of CYP450 A1 indices, PCB and 1OH-pyrene concentration in flounder, *Platichthys flesus*, from the Dutch Wadden Sea. *Chemosphere*, 33: 1579-1596
- Evans D.H., 1987.** The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environ Health Perspec.*, 71:47-58.
- Fatima M., I. Ahmad, I. Sayeed, M. Athar, y S. Raisuddin, 2000.** Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. *Aquat. Toxicol.*, 49:243-250.
- Fenech, M., 1997.** The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 392(1-2):11-18.
- Fent K., 2004.** Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, 205:223-240
- Forlin, L., C. Haux, L. Karlsson-Norrgrén, P. Runn, y A. Larsson, 1986.** Biotransformation enzyme activities and histopathology in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, treated with cadmium. *Aquatic Toxicology*, 8(1):51-64.
- Fridovich, I., 1986.** Superoxide dismutases. *Ad. Enzymology*, 58: 61-97.
- George, S.G., 1994.** Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. p. 37-85 In: D.C. Malins, G.K. Ostrander (Eds.), *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular perspectives*. Lewis Publishers, CRC Press.
- Gill, T.S., J. Pande, y H. Tewari, 1990.** Enzyme modulation by sublethal concentrations of aldicarb, phosphamidon, and endosulfan in fish tissues. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 38(3):231-244.
- Goksoyr, A., y L. Forlin, 1992.** The P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, 22:287-312.
- Guengerich, F.P., y D.C. Liebler, 1985.** Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolites. *Crit Rev Toxicol.*, 14:259-307.
- Hai D.Q., I. Sz. Varga, y M. Matkovics, 1997.** Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 117C:83-88.
- Hamza-Chaffai, A., C. Amiard-Triquet, y A. El Abed, 1997.** Metallothionein-like protein: is it an efficient biomarker of metal contamination? A case study based on fish from the Tunisian coast. *Arch Environ Contam Toxicol.*, 33(1):53-62.
- Handy, R.D., T.S. Galloway, y M.H. Depledge, 2003.** A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology*, 12:331-343.
- Hazarika A., S.N. Sarkar, S. Hajare, M. Kataria, y J.K. Malik, 2003.** Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. *Toxicology*, 185:1-8.
- Hinton, D.E., y D.J. Lauren, 1990.** Liver structure alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. p. 17-57. In: J.F. McCarthy and L.R. Shugart (Eds). *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers.
- Hodge S., M. Longley, L. Booth, V. Heppelthwaite, y K. O'Halloran, 2000.** An evaluation of glutathione S-transferase activity in the tasmanian lacewing (*Micromus tasmaniae*) as a biomarker of organophosphate contamination. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 65(1):8-15.
- Kamohara K., N. Yagi, y Y. Itokawa, 1984,** Mechanism of lipid peroxidation in polychlorinated biphenyl PCB and dichlorodiphenyltrichloroethane DDT-poisoned rats. *Environmental Research*, 324:18-23
- Kosmala, A., B. Migeon, P. Flammarion, y J. Garric, 1998.** Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using the fish biomarker ethoxyresorufin-O-deethylase: field and on-site experiments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41(1):19-28.
- Kozlovskaya, V.I., F.L. Mayer, O.V. Menzikova, y G.M. Chuyko, 1993.** Cholinesterases of aquatic animals. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 132, 117-140.

- Livingstone, D.R., 1993.** Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J Chem Technol Biotechnol.*, 57:195-211
- Mayer, F.L., D.J. Versteeg, M.J. McKee, L.C. Folmar, R.L. Graney, D.C. McCume, y B.A. Rattner. 1992.** Physiological and non-specific biomarkers, p. 5-85. *In:* R.J. Huggett, R.A. Kimerie, P.M. Mehrle Jr and H.L. Bergman (Eds). Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. SETAC / Lewis publishers. Boca Raton, USA.
- Mehrle, P.M., D.R. Buckler, E.E. Little, L.M. Smith, y J.D. Petty, 1988.** Toxicity and bioconcentration of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran in rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 7(1):47-62.
- Müller, W.W., y G. Streffer, 1994.** Micronucleus assays. *In:* G. Obe (Ed). Advances in Mutagenesis Research. Springer Verlag. Berlin
- Nebert, D.W., A. Puga, y V. Vasilidou, 1993.** Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann NY Acad Sci.*, 685:624-640.
- Orbea A., I. Marigomez, C. Fernandez, J.V. Tarazona, I. Cancio, y M.P. Cajaraville, 1999.** Structure of peroxisomes and activity of the marker enzyme catalase in digestive epithelial cells in relation to PAH content of mussels from two Basque estuaries (Bay of Biscay): seasonal and site-specific variations. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 36:158-166.
- Otto, D.M.E., T.W. Moon, 1995.** 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl effects on antioxidant enzymes and glutathione status in different tissues of rainbow trout. *Pharmacol. Toxicol.*, 77:281-287.
- Page, D.S., R.J. Huggett, J.J. Stegeman, K.R. Parker, B. Woodin, J.S. Brown, y A.E. Bence, 2004.** Polycyclic aromatic hydrocarbon sources related to biomarker levels in fish from Prince William Sound and the Gulf of Alaska. *Environmental Science & Technology*, 38(19): 4928-36.
- Pawert, M., E. Mueller, y R. Triebkorn, 1998.** Ultrastructural changes in fish gills as biomarker to assess small stream pollution. *Tissue & Cell*, 30(6):617-626.
- Porto, J.I., C.S. Araujo, y E. Feldberg, 2005.** Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research*, 97(3):287-292.
- Radhakrishnaiah, K., y B. Renukadevi, 1989.** Effect of pesticides on succinate and lactate dehydrogenase activities in the freshwater field crab, *Oziotelphusa senex senex* (Fabricius). Proceedings of the Indian National Science Academy NSBGAM 55B(5/6):339-344.
- Ronisz, D., D.G.J. Larsson, y L. Förlin, 1999.** Seasonal variations in the activities of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Comp Biochem Physiol.*, 124: 271-279
- Sancho, E., M.D. Ferrando, y E. Andreu, 1997.** Inhibition of gill Na⁺, K⁺-ATPase activity in the eel, *Anguilla anguilla*, by fenitrothion. *Ecotox. Environ. Saf.*, 38:132-136.
- Sanders, B., 1990.** Stress proteins: Potential as multitermed biomarkers. p. 165. *In:* J.F. McCarthy and L.R. Shugart (Eds). Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers. Boca Raton, USA.
- Sayed I., S. Parvez, S. Pandey, B. Bin-Hafeez, R. Haque, y S. Raisuddin, 2003.** Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus*. *Bloch. Ecotox. Environ. Saf.*, 56:295-301.
- Schwaiger, J., R., y D. Negele, 1998.** Plasma vitellogenin - a blood parameter to evaluate exposure of fish to xenoestrogens. *Acta Vet. Brno*, 67: 257-264.
- Sharma B., y K. Gopal, 1995.** Changes in lactic acid content and activity of lactate dehydrogenase in *Clarias batrachus*, exposed to carbaryl. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 47(1-2):89-95.
- Singh, R.K. y B. Sharma, 1998.** Carbofuran-induced biochemical changes in *Clarias batrachus*. *Pesticide Science*, 53(4):285-290.
- Sipes, I.G., y A.J. Gandolfi, 1991.** Biotransformation of toxicants, p. 88-126. *In:* M.O. Amdur, J. Doull, C.D. Klaassen, Casarett and Doull's toxicology. Pergamon Press.
- Stahlschmidt-Allner, P., B. Allner, J. Römbke, T. Knacker, 1997.** Endocrine disrupters in the aquatic environment. *Environ Science Poll Research* 4(3):155-162.
- Stegeman, J.J., M. Brouwer, T.D.G. Richard, L. Förlin, B.A. Fowler, B.M. Sanders, y P.A. van Veld, 1992.** Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect, p. 235-335. *In:* R.J. Huggett, R.A. Kimerly, P.M. Mehrle Jr, H.L. Bergman, (Eds.), Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA.

- Stephensen, E., M. Adolfsson-Erici, M. Celander, M. Hulander, J. Parkkonen, T. Hegelund, J. Sturve, L. Hasselberg, M. Bengtsson, y L. Foerlin, 2003.** Biomarker responses and chemical analyses in fish indicate leakage of polycyclic aromatic hydrocarbons and other compounds from car tire rubber. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22(12):2926-2931.
- Takahashi, N., R.H. Dashwood, L.F. Bjeldanes, G.S. Bailey, y D.E. Williams, 1995.** Regulation of hepatic cytochrome P4501A by indole-3-carbinol: Transient induction with continuous feeding in rainbow trout. *Food and Chemical Toxicology*, 33(2):93-172.
- Thomas, P., 1990.** Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. *American Fisheries Society Symposium*, 8:9-28
- Thompson, H.M., y P.W. Grieg-Smith, 1991.** Monitoring the effects of agricultural pesticides on wildlife, p. 79-94. In: D.W. Jeffrey, and B. Madden, (Eds.). *Bioindicators and Environmental Management*. Academic Press.
- Thompson, H.M., 1999.** Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology*, 8:369-384.
- Tucker, J.D., y R.J. Preston, 1996.** Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat Research*, 365:147-159.
- Tyler, C.R., B. Van der Eerden, S. Jobling, G. Panter, y J.P. Sumpter, 1996.** Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish. *Journal of Comparative Physiology*, 166(7):418-426.
- US NRC, 1989.** Biologic markers in reproductive toxicology. US National Research Council. Washington, DC, National Academy Press.
- van der Oost, R., J. Beyer, y N.P.E. Vermeulen, 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13:57-149.
- Varo, I., R. Serrano, E. Pitarch, F. Amat, F.J. Lopez, y J.C. Navarro, 2002.** Bioaccumulation of chlorpyrifos through an experimental food chain: study of protein HSP70 as biomarker of sublethal stress in fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(2): 229-235.
- Vassault, A., 1983.** Lactate dehydrogenase, p. 118-126. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. III. Academic Press, NY.
- Walker, M.K., y R.E. Peterson, 1991.** Potencies of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners, relative to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, for producing early life stage mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 21(3-4):219-237.
- WHO, 1986.** Organophosphorus insecticides: a general introduction. Environmental Health Criteria No. 63. IPCS/WHO. Geneva.
- WHO, 1993.** Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria No. 155. IPCS/WHO. Geneva.
- WHO, 2001.** Biomarkers in risk assessment: validity and validation. Environmental Health Criteria No. 222. IPCS/WHO. Geneva.
- Whyte, J.J. R.E. Jung, C.J. Schmitt, y D.E. Tillitt, 2000.** Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, 30(4):347-570.
- Willett, K.L., S.J. McDonald, M.A. Steinberg, K.B. Beatty, M.C. Kennicutt, y S.H. Safe, 1997.** Biomarker sensitivity for polynuclear aromatic hydrocarbon contamination in two marine fish species collected in Galveston Bay, Texas. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(7):1472-1479.
- Winston, G.W., y R.T. Di Giulio, 1991.** Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 19, 137-161.

Sobrino-Figueroa, A., A. V. Botello, y S. Villanueva-Fragoso, 2005. Efectos de compuestos genotóxicos de tres sistemas costeros de Veracruz, p. 141-156. In: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 p. .

Efectos de Compuestos Genotóxicos de Tres Sistemas Costeros de Veracruz

**Alma Sobrino-Figueroa¹, Alfonso V. Botello²
y Susana Villanueva-Fragoso²**

¹ Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

² Instituto de Ciencias del Mar y Limnología-UNAM

6

RESUMEN

El presente estudio se centró en la detección de compuestos genotóxicos en agua y sedimento de las lagunas de Pueblo Viejo, Tamiahua y Tampamachoco, con el objeto de evaluar los efectos tóxicos de estos contaminantes en organismos de importancia económica (*Crassostrea virginica* y *Mugil cephalus*) y delimitar áreas potenciales de riesgo ambiental y a la salud humana. Los análisis se realizaron en muestras de tejido de branquia de ostión y de sangre de lisas. Los resultados señalan diferencias evidentes en cuanto al número y el grado de daño genético en las células de los organismos provenientes de cada sistema lagunar, siendo los especímenes de Tampamachoco los que presentaron el mayor número de células con daño. A partir de los resultados obtenidos se detectaron áreas potenciales de riesgo: una localidad de la laguna de Pueblo Viejo (Barranco amarillo), cuatro en la laguna de Tamiahua (Punta Mangle, Cabo Rojito, Boca Río Cucharas, Estero Tanconchín) y una en la laguna de Tampamachoco (La Paloma). Los efectos genotóxicos se correlacionaron con las concentraciones de contaminantes registrados en los sitios (Cd, Cr, Pb y HAPs). En estos lugares, el consumo de organismos proveniente de sitios de cultivo (ostión) y/o por pesca (lisa) pueden a su vez implicar un riesgo a la salud humana.

ABSTRACT

The aim of this study was to detect genotoxic compounds in water and sediments from 3 coastal lagoons (Pueblo Viejo, Tamiahua and Tampamachoco) and to evaluate the toxic effect in native organisms of economical importance (*Crassostrea virginica* and *Mugil cephalus*), as well as, to establish potential areas of environmental and human health risk. Analyses were conducted in oyster gill tissue and lisa blood samples. Significant differences were found between the number and the degree of genetic damage in the organisms cells from each lagoon system, where the organisms from Tampamachoco presented the major number of cells with genetic damage. Potential risk zones were detected in one location in the Pueblo Viejo Lagoon (Barranco amarillo), four in Tamiahua (Punta Mangle, Cabo Rojito, Boca Río Cucharas, Estero Tanconchin) and one in Tampamachoco (La Paloma). The degree of genotoxic effects were correlated with the levels of contaminants registered in the study sites (Cd, Cr, Pb and PAHs). The consumption of organisms from oyster culture and lisa fisheries from these areas, represents a potential risk for environmental and human health.

INTRODUCCIÓN

Los materiales genotóxicos, son aquellos que alteran la información genética de un organismo o población, lo que puede ocasionar la aparición de organismos aberrantes o poco aptos para sobrevivir, además de ocasionar procesos de carcinogénesis (Kruif y Zwart, 1988; Quillardet, P. y M. Hofnung, 1993; Dreisbach y Robertson, 1998). Este tipo de compuestos varían en su composición y grado de toxicidad. En su mayoría son hidrocarburos aromáticos, bifenilos policlorados y dioxinas (Albert *et al.*, 1988; Dreisbach y Robertson, 1998). No obstante también diversos metales presentan este tipo de acción. El cromo en su forma de Cr⁺⁶ (hexavalente) induce la formación de sitios de rotura en la cadena del ADN, además de producir aberraciones cromosómicas (Gauglhofer y Bianchi, 1991); el plomo altera el funcionamiento de los sistemas de reparación del ADN, ocasionando también, aberraciones cromosómicas (Ewers y Schlikioter, 1991). A su vez, el cadmio inhibe los sistemas de reparación del ADN y forma aductos uniéndose a la adenina y purina (Moore, 1991; Stoepler, 1991).

Los efectos que éstos compuestos puede tener dentro de un sistema son críticos si se toma en cuenta el sinergismo con otro tipo de factores, lo que puede ocasionar un daño severo a los organismos sensibles a estos tóxicos (Amalacher, 1961; Ramade 1989). Asimismo, puede afectar la productividad de los ecosistemas acuáticos, lo que puede repercutir en las actividades de tipo económico que se realicen en ellos, como el abatimiento de poblaciones de importancia económica.

Es amplio el desconocimiento de los efectos de los contaminantes sobre los organismos nativos de los sistemas costeros mexicanos. Por ello, este estudio pretende detectar cualitativamente la presencia de contaminantes genotóxicos en muestras de agua y sedimentos de tres lagunas (Pueblo Viejo, Tamiahua y Tampamachoco), ubicadas en el estado de Veracruz y evaluar su efecto en dos especies locales de importancia económica, el ostión *Crassostrea virginica* y el pez *Mugil cephalus* conocido como lisa.

ÁREA DE ESTUDIO

Las lagunas de Pueblo Viejo, Tamiahua y Tampamachoco se localizan en la llanura costera del Golfo de México, entre las poblaciones de Tuxpan y Tampico, al Norte del estado de Veracruz, formando parte de las cuencas hidrológicas de los ríos Tuxpan y Pánuco. El área de estudio esta delimitada por las coordenadas geográficas 20° 57' y 22° 13' Lat N y 97° 19' y 98° 80' Long W (Contreras, 1988). Esta zona constituye una región muy importante de producción petrolera e industrial. Los ríos que desembocan a estos sistemas costeros son utilizados como vías naturales de eliminación de desechos, por lo que el aporte de contaminantes que reciben estos ecosistemas costeros es considerable (Botello *et al.*, 1994).

En la laguna de Tampamachoco se han detectado elevadas concentraciones de cromo en agua que oscilan entre 0.005 a 5.09 µg/g sobrepasando los límites permisibles por la Normas Mexicanas (Criterios Ecológicos de Calidad del Agua, 1989; Rosas *et al.*, 1983).

Pérez-Hernández *et al.* (1994) encontraron que en los sedimentos de éste cuerpo lagunar, los niveles de algunos metales como plomo y cromo son extremadamente elevados (70.66 y 62 µg/g, respectivamente), en comparación a los encontrados en los otros dos sistemas de estudio. Villanueva y Botello (1998) realizaron una recopilación de los trabajos realizados en Tampamachoco y reportan que la concentración promedio de metales en el sedimento fue (de mayor a menor concentración): Cd (2.06 ± 1.2 µg/g) > Pb (1.86 ± 0.95 µg/g) > Cr (0.89 ± 0.59 µg/g). No obstante en un trabajo previo, se registraron niveles máximos de cadmio, cromo y plomo en sedimentos de 2.2, 34.69 y 44.14 µg/g respectivamente (Botello *et al.*, 1995).

En la laguna de Pueblo Viejo se han registrado niveles promedio de cadmio en el agua de 5.5 µg/l valor que rebasa los límites máximos permisibles establecidos en los Criterios Ecológicos de Calidad de Agua (0.9 µg/l), siendo este registro el más elevado en compara-

ción a los encontrados en los otros dos sistemas de estudio (Cárdenas, 1990). En los sedimentos de esta laguna se reportan concentraciones promedio de cadmio, cromo y plomo de 2.28, 48.89 y 63.61 $\mu\text{g/g}$ respectivamente, mientras que en la laguna de Tamiahua los registros obtenidos en sedimentos fueron de 1.85, 47.78 y 39.13 $\mu\text{g/g}$, respectivamente (Botello *et al.*, 1995).

Botello y Calva (1998), realizaron una evaluación de los niveles de hidrocarburos aromáticos en los sedimentos de las 3 lagunas, encontrando valores promedio totales de 14.79 $\mu\text{g/g}$ (Pueblo Viejo), 23.91 $\mu\text{g/g}$ (Tamiahua) y 17.92 $\mu\text{g/g}$ (Tampamachoco). Por otro lado, Rosales *et al.* (1979) detectaron endosulfan (0.06 ppb), clordano (0.1 ppb) y DDT (16 ppb) en los sedi-

mentos de la Laguna de Pueblo Viejo, así como dieldrin (1.1 ppb) en Tampamachoco.

En los sistemas lagunares de estudio se realizan importantes actividades de pesca a nivel local y regional, además de cultivo y explotación de ostión (*Crassostrea virginica*), siendo la laguna de Tamiahua el primer productor de este molusco (SEPESCA, 1998). A su vez, la lisa (*Mugil cephalus*) constituye un recurso pesquero de importancia en los sistemas costeros mexicanos; debido a sus hábitos alimenticios de tipo detritívoro, es una especie que bioacumula una gran cantidad de sustancias, principalmente metales pesados (Amalacher, 1961) los cuales pueden ser transferidos a través de la cadena trófica afectando a los consumidores de esta especie, desde aves marinas a incluso el hombre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Trabajo de Campo

El estudio se efectuó en tres épocas del año (lluvias, sep 94; secas, mar 95; nortes, oct 95). Se fijó una red de estaciones de recolecta en los tres sistemas (Fig. 1). En cada sitio se tomaron muestras de agua (1 L) con una botella muestreadora Van door y de sedimento (400 g) con una draga Van veen con recubrimiento epóxico; las muestras se conservaron en hielo, para ser transportadas al laboratorio y se conservaron en frío ($< 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta su procesamiento según lo recomendado por USEPA (1982) y ASTM (1994).

Los ostiones se colectaron por medio del arte de pesca conocido como gafas o rastrillo de los bancos de: La Laja, localizado en la zona norte de la laguna de Tamiahua; La Tapada, en la parte Norte de la laguna de Pueblo Viejo y, en el banco cercano al estero Jacome en la laguna de Tampamachoco (Fig. 1). Los organismos (8.5 ± 1.5 cm de longitud de la concha) se colocaron dentro de bolsas de plástico y, se transportaron en hielo hasta el laboratorio donde se tomaron de inmediato los datos de morfometría y las muestras de tejido (Singh *et al.*, 1988).

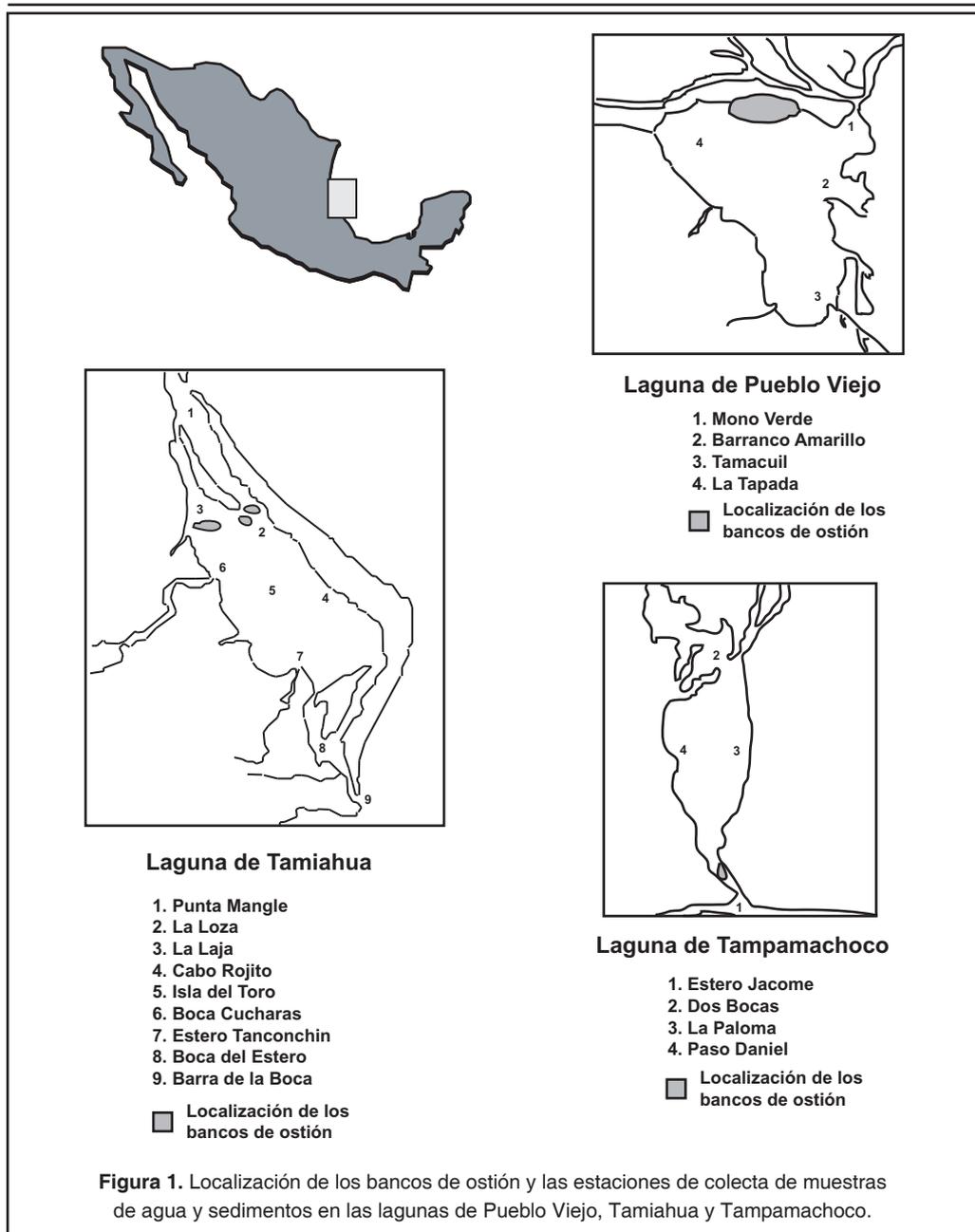
Se capturaron juveniles de lisa *Mugil cephalus* (15 ± 3 cm de longitud total) por medio de un chinchorro en 2 localidades de la laguna de

Pueblo Viejo (Barranco Amarillo y Tamacuil), 7 en Tamiahua (Punta Mangle, La Laja, isla de Burros, Cabo Rojito, isla del Toro, Tanconchín y el Guayabito) y 1 en Tampamachoco (Paso Daniel). Se tomaron muestras de sangre por punción cardiaca con jeringas desechables estériles heparinizadas, las cuales se conservaron en frío (4°C) para ser transportadas al laboratorio. Las muestras se procesaron antes de 24 horas de tomada la alícuota de sangre.

Trabajo de Laboratorio

Determinación de Genotóxicos en las Muestras de Agua y Sedimentos

A las muestras de agua y sedimento recolectadas en las tres diferentes épocas del año se les evaluó de manera cualitativa la presencia de compuestos genotóxicos por medio de la prueba de SOS-Chromotest. Esta prueba consiste en un microbioensayo utilizando una cepa de *Escherichia coli* manipulada genéticamente, a la cual se le insertó un gen que sintetiza β -galactosidasa en el gen SOS de reparación de ADN. La cepa, al estar en contacto con algún agente genotóxico, activa el sistema de reparación SOS el cual a su vez activa la producción



de β -galactosidasa; la presencia y concentración de la enzima, se realiza por medio de un análisis colorimétrico, donde el daño es directamente proporcional a la concentración de la enzima (Quillardet y Hofnung, 1993).

De cada muestra de sedimento se obtuvo un extracto, siguiendo el método descrito por Kwan y Dutka (1990). A cada muestra (300 g) se le adicionó agua MiliQ en proporción 1:1; las mezclas se sonicaron durante 30 minutos en

un baño ultrasónico y se centrifugaron en frío a 2,500 rpm durante 25 min. Los sobrenadantes (elutriados) se colectaron y se utilizaron para la realización de las pruebas de genotoxicidad. Las muestras de agua fueron evaluadas directamente.

Para la determinación de la presencia de compuestos genotóxicos, las muestras de agua y los elutriados de los sedimentos fueron tratados con y sin activación metabólica con la

fracción S-9. La fracción S-9 consiste en un concentrado de enzimas las cuales están implicadas en el proceso de activación (modificación) de compuestos, simulando el proceso ocurrido al entrar los compuestos al organismo y ser biotransformados (Maron y Ames, 1983). Con los resultados obtenidos en los bioensayos se calculó el Potencial de Inducción del SOS (SOSIP), siguiendo las recomendaciones de Quillardet *et al.* (1993).

Paralelamente, se determinó la concentración de metales (cadmio, cromo y plomo) e hidrocarburos policíclicos aromáticos totales (HPAs) en muestras de sedimentos provenientes de los mismos sitios de estudio (Botello, 1995; Botello y Calva, 1998) los cuales permitieron establecer la relación entre los valores de genotoxicidad de los sedimentos (SOSIP) obtenidos en este estudio y los niveles de metales (Cd, Cr y Pb) e hidrocarburos aromáticos, obtenidos por Botello *et al.* (1995) y Botello y Calva (1998) respectivamente. Para ello, se efectuó un análisis de correlación múltiple, donde se determinó el grado de relación entre las variables implicadas (Zar, 1996), por medio del programa de cómputo Stata versión 7.

Evaluación de Daño Genético

Se determinó el daño genético en muestras de sangre de lisa (leucocitos) obtenidas en las 3 diferentes épocas del año (lluvias, secas y nortes) así como en el tejido de la branquia de ostiones recolectados durante lluvias y secas, por medio de la técnica de electroforesis unicelular (ensayo del cometa) (Singh *et al.*, 1988; Tice, 1995). Esta técnica consiste en la evaluación de la integridad del material genético en una muestra de por lo menos 100 células, las cuales se rompen en condiciones alcalinas y con los núcleos obtenidos, se realiza una electroforesis. La migración del núcleo forma una cauda similar a la cola de un cometa, con el material genético dañado, donde la longitud de la cauda del cometa es proporcional al grado de daño que tiene la célula.

Las muestras de tejido de branquia de ostión se disgregaron manualmente en buffer de fosfatos (Tice, 1995). Las muestras de sangre de lisa se centrifugaron a 1000 rpm durante 20 min para obtener la fracción de leucocitos. En cada caso se evaluó la viabilidad celular con azul tripano (Tice, 1995). Posteriormente se tomaron 20 μ l de cada disgregado ó sobrenadante, los cuales se colocaron sobre una capa de agarosa soportada en un portaobjetos esmerilado y posteriormente se aplicó otra capa de agarosa de punto de fusión bajo sobre la muestra. Los portaobjetos con las muestras de células (tres por cada organismo) se colocaron en solución de lisis (NaCl 2.5 M, EDTA 100mM, Tris 10mM, Tritón X100 1% y DMSO 10%) durante 1 h. Después, se colocaron en la cámara de electroforesis en solución buffer (NaOH 10N, EDTA 200 mM, pH 13) y se desarrolló la prueba durante 20 min, a 300 amp y 25 volts. Al terminar, las preparaciones se tiñeron con 75 μ l de bromuro de etidio y se analizaron en un microscopio de epifluorescencia con un filtro de 560 nm. Se calculó la frecuencia de células con y sin estela de una muestra de 100 células por organismo y se determinó el tamaño de las caudas de los cometas en un analizador de imágenes.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística de comparación múltiple no paramétrica de Kruskal Wallis–Newman Keuls, para determinar las diferencias significativas entre época del año y entre las lagunas en estudio, debido a que el número de muestras fue variable y no se cumplen con los requisitos de normalidad (previamente se aplicó un análisis exploratorio con la prueba de Kolmogorov–Smirnov para probar normalidad) (Zar, 1996). Asimismo, se realizó un análisis de correlación múltiple (Zar, 1996) entre los datos de daño genético (longitud de la cauda de las células) y las concentraciones de los metales Cd, Cr y Pb (Botello *et al.*, 1995) e hidrocarburos aromáticos (Botello y Calva, 1998) presentes en los sedimentos de los 3 sistemas bajo estudio. Los análisis se realizaron con el programa Stata versión 7.

RESULTADOS

Determinación de Genotóxicos en Muestras de Agua y Sedimento

Se procesaron un total de 90 muestras de agua de las cuales 43 presentaron actividad genotóxica. A lo largo de las tres épocas del año (secas, lluvias y nortes), los compuestos genotóxicos se detectaron en tres localidades de la laguna de Pueblo Viejo (Barranco Amarillo, Tamacuil, La Tapada), en cinco localidades de la laguna de Tamiahua (Punta mangle, La Laja, Isla del Toro, Boca del río Cucharas y en la boca del estero Tanconchin) y en los sitios de

la Paloma (lugar cercano a una termoeléctrica) y Paso Daniel, en la laguna de Tampamachoco. En Mono Verde (laguna de Pueblo Viejo) y Cabo Rojito (laguna de Tamiahua) solo hubo presencia de genotóxicos en la temporada de nortes mientras que en el estero Jacome (Tampamachoco) se detectaron compuestos con efectos sobre el ADN sólo durante la temporada de secas. Los únicos lugares, en los cuales no se encontraron compuestos con acción sobre el material genético, fueron La Loza ubicado en la laguna de Tamiahua y Dos Canales ubicado en la laguna de Tampamachoco (Tabla 1).

Tabla 1. Presencia de compuestos genotóxicos en las muestras de agua de las lagunas de Pueblo Viejo, Tamiahua y Tampamachoco (con y sin activación metabólica) durante las épocas de secas (1994), lluvias (1994) y nortes (1995).

Epoca	Secas (Mayo 1994)		Lluvias (Septiembre 1994)		Nortes (Marzo 1995)	
	Genotoxicidad con activación	Genotoxicidad sin activación	Genotoxicidad con activación	Genotoxicidad sin activación	Genotoxicidad con activación	Genotoxicidad sin activación
Pueblo Viejo						
1. Mono verde	no	no	no	no	si	si
2. Barranco Amarillo	no	si	no	si	si	si
3. Tamacuil	no	si	no	si	no	si
4. La Tapada	no	si	no	si	no	si
Tamiahua						
1. Punta Mangle	si	si	si	si	no	si
2. La Loza	no	no	no	no	no	no
3. La Laja	no	si	no	si	no	si
4. Cabo Rojito	no	no	np	no	no	si
5. Isla del Toro	no	si	no	si	si	si
6. Boca del Río Cucharas	no	si	no	si	si	si
8. Boca del Estero Tancochín	no	si	no	si	si	si
Tampamachoco						
1. Estero Jacome	no	si	no	no	no	no
2. Dos Canales	no	no	no	no	no	no
3. La Paloma	si	si	si	si	si	si

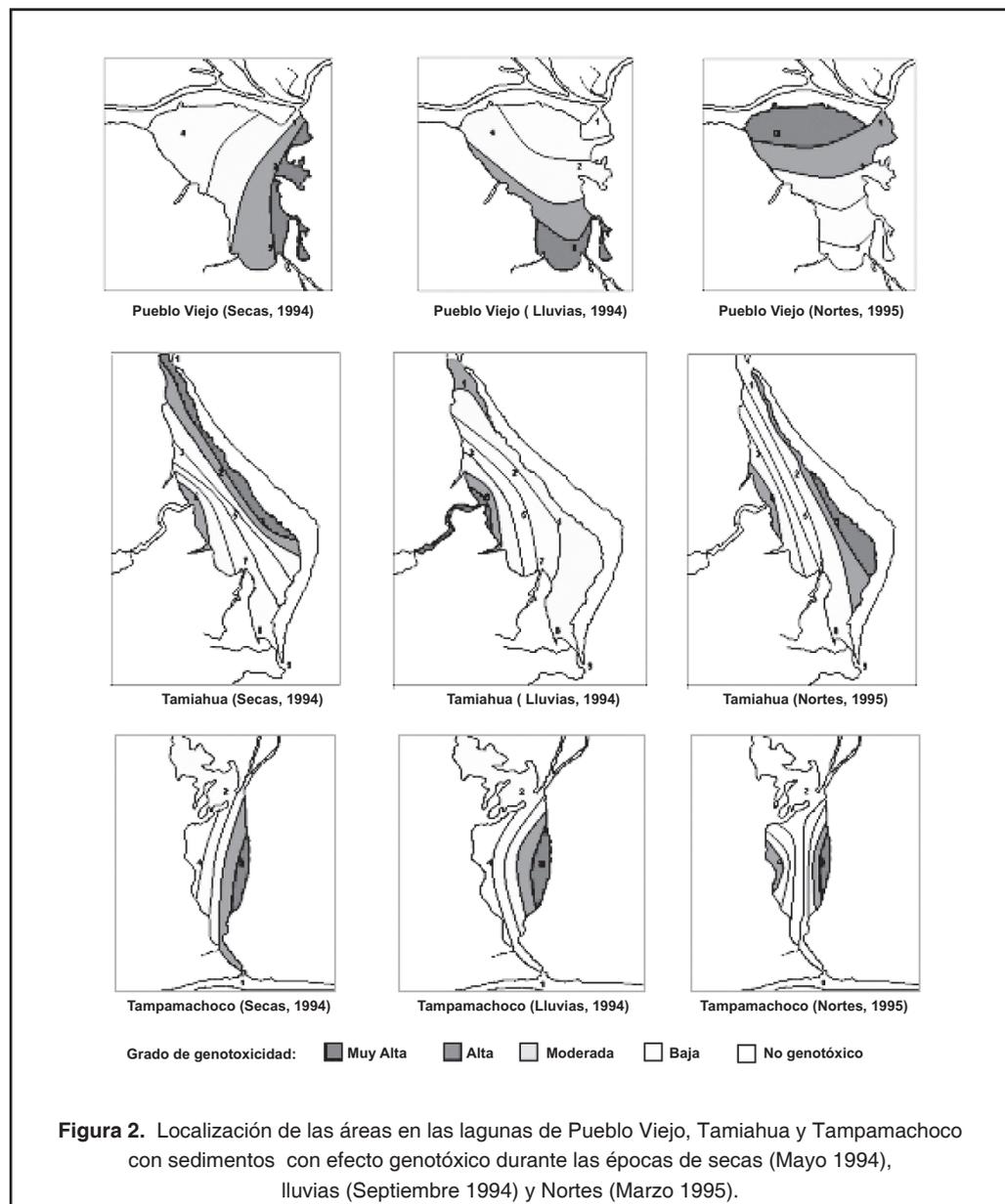
Asimismo, se evaluaron un total de 51 muestras de sedimento. Se detectaron compuestos genotóxicos (con activación metabólica) a lo largo de las tres temporadas del año en 6 localidades: Barranca Amarillo (laguna de Pueblo Viejo); Punta Mangle, Cabo Rojito, boca del río Cucharas y estero Tanconchín (laguna de Tamiahua); y La Paloma (laguna de Tampamachoco) (Tabla 2 y Fig. 2). En la laguna de Pueblo Viejo, no se detectó acción genotóxica en los sedimentos provenientes de Mono Verde durante lluvias y nortes, ni en Tamacuil durante nortes o en La Tapada durante secas y lluvias. A su vez, en la laguna de Tamiahua no se advirtió la presencia de compuestos de letéreos a lo largo del año en los sedimentos

provenientes de La Laja, Isla del Toro y Boca del Estero ni en La Loza durante la se secas y lluvias o en la Barra de la Boca durante lluvias y nortes. En la laguna de Tampamachoco, no se obtuvo efecto genotóxico en los sedimentos provenientes de las localidades del Estero Jacome durante lluvias, de Dos Canales durante secas y nortes y de Paso Daniel durante secas y lluvias (Tabla 2 y Fig. 2).

La relación entre la genotoxicidad (SOSIP) y los niveles de contaminantes presentes en las muestras de sedimento de la laguna de Pueblo Viejo, determinada en el análisis de correlación múltiple, indicó que existe relación significativa entre el efecto genotóxico y los niveles de cro-

Tabla 2. Presencia de compuestos genotóxicos en las muestras de sedimento de las lagunas de Pueblo Viejo, Tamiahua y Tampamachoco durante las épocas de secas (1994), lluvias (1994) y nortes (1995).

Epoca	Secas (Mayo 1994)	Lluvias (Septiembre 1994)	Nortes (Marzo 1995)
Laguna	Genotoxicidad con activación	Genotoxicidad con activación	Genotoxicidad con activación
Pueblo Viejo			
1. Mono verde	si	no	no
2. Barranco amarillo	si	si	si
3. Tamacuil	si	si	no
4. La Tapada	no	no	si
Tamiahua			
1. Punta Mangle	si	si	si
2. La Loza	no	no	si
3. La Laja	no	no	no
4. Cabo Rojito	si	si	si
5. Isla del Toro	no	no	no
6. Boca del río Cucharas	si	si	si
7. Estero Tanconchín	si	si	si
8. Boca del Estero	no	no	no
9. Barra de la Boca	si	no	no
Tampamachoco			
1. Estero Jacome	si	no	si
2. Dos Canales	no	si	no
3. La Paloma	si	si	si
4. Paso Daniel	no	no	si



mo y plomo durante las temporadas de secas y lluvias y con la concentración de cromo durante la época de nortes ($p < 0.05$). En la laguna de Tamiahua se observaron relaciones significativas para la concentración de HAPs en la estación de secas, los niveles de cadmio en lluvias y los valores de cromo, plomo y HAPs en nortes ($p < 0.05$). En la laguna de Tampamachoco se observó una relación significativa entre la genotoxicidad y los niveles de cadmio, plomo y HAPs durante la época de secas y con los HAPs durante las temporadas de lluvias y nortes ($p < 0.05$) (Tabla 3).

Evaluación de Daño Genético

Se analizaron un total de 77 alícuotas de sangre obtenidas de las lisas vivas (*Mugil cephalus*). La viabilidad celular en las muestras de leucocitos fue superior al 85%, en todos los casos. Los resultados del análisis del daño genético indican que en la mayoría de los casos existen diferencias evidentes en cuanto al número y el grado de daño de las células de los peces de cada sistema lagunar (Tabla 4). Los organismos provenientes de la laguna de Tampamachoco presentaron el mayor número

Tabla 3. Correlación (r) entre la genotoxicidad (SOSIP) y los niveles de contaminantes registrados en las muestras de sedimentos de las lagunas de Pueblo Viejo, Tamiahua y Tampamachoco en las épocas de secas, lluvias y nortes.

Laguna	Cadmio	Cromo	Plomo	HPAs
Pueblo Viejo				
Secas	-0.973	0.998 *	0.783 *	-0.2318
Lluvias	-0.424	0.997 *	0.9042 *	-0.2168
Nortes	0.2604	0.9995 *	0.4511	-0.3815
Tamiahua				
Secas	-0.1108	-0.9905	-0.5811	0.6558 *
Lluvias	0.9284 *	0.0276	0.4552	0.2502
Nortes	-0.0296	0.8223 *	0.7384 *	0.9833 *
Tampamachoco				
Secas	0.6897 *	-0.1089	0.8062 *	0.8846 *
Lluvias	-0.5692	-0.637	-0.3856	0.7901 *
Nortes	-0.5692	-0.6607	-0.6467	0.9786 *

* Relación significativa (p< 0.05).

Tabla 4. Daño genético en leucocitos de lisa (*Mugil cephalus*) colectadas en las lagunas de Pueblo Viejo, Tamiahua y Tampamachoco durante las épocas de secas (1994), lluvias (1994) y nortes (1995).

Epoca del Año	Laguna	Número de Organismos	Células sin cauda %	Células con cauda %	Longitud de la cauda μm
Secas	Pueblo Viejo	10	20.7	79.3 ^{a1}	31.32 \pm 1.13 ^{a2}
	Tamiahua	12	12.1	56.7 ^{b1}	22.09 \pm 0.49 ^{b2}
	Tampamachoco	8	0	100 ^{c1}	71.88 \pm 13.78 ^{c2}
Lluvias	Pueblo Viejo	8	20.1	77.1 ^{a1}	10.87 \pm 3.25 ^{a1}
	Tamiahua	12	52.7	47.2 ^{b1}	10.48 \pm 6.56 ^{a1}
	Tampamachoco	6	8.3	91.6 ^{c1}	12.6 \pm 2.68 ^{a1}
Nortes	Pueblo Viejo	8	12.2	87.8 ^{a2}	45.31 \pm 2.68 ^{a3}
	Tamiahua	1	0.5	79.6 ^{a2}	31.75 \pm 21.32 ^{a3}
	Tampamachoco	5	0	100 ^{b1}	91.5 \pm 72.4 ^{b3}

Distintas letras denotan diferencias significativas entre lagunas en una misma época (p < 0.05).
Distintos números denotan diferencias significativas entre épocas para una laguna (p < 0.05).

de células con daño (91.6% a 100%), y el mayor tamaño de las estelas (12.6 a 91.4 μm) en las tres épocas del año analizadas. Los especímenes colectados en la laguna de Pueblo Viejo presentaron un 77% , 79% y 87 % de células con lesión en su ADN en las épocas de secas, lluvias y nortes, así como cometas con

longitudes de 10.9, 31.3 y 45 μm respectivamente. Los organismos de la laguna de Tamiahua presentaron el menor número de células con lesiones (47.2 a 79.5%) así como caudas cortas (10.5 a 31.7 μm) en las 3 temporadas analizadas.

Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la longitud de los cometas obtenidos de los leucocitos de los peces pertenecientes a cada sistema lagunar en las estaciones de secas y nortes; sin embargo, no se apreciaron diferencias en las dimensiones de las caudas de los cometas de los especímenes colectados en las lagunas durante la época de lluvias ($p > 0.05$) (Tabla 4). De acuerdo a los resultados obtenidos, los organismos con mayor daño en sus leucocitos fueron los peces de Tampamachoco, seguidos por los de Pueblo Viejo y por último los de Tamiahua. A su vez, durante la época de nortes se observaron los efectos más drásticos.

El efecto deletéreo del ADN de los leucocitos de la sangre de *M. cephalus* (longitud de la cauda) se correlacionó significativamente ($p < 0.05$) con los niveles de cadmio y cromo presentes en las muestras de sedimento en la laguna de Pueblo Viejo, mientras que en Tamiahua se estableció con las concentraciones de cadmio y en Tampamachoco con los hidrocarburos aromáticos (Tabla 5).

En el ostión, se procesaron un total de 53 muestras de branquia en las cuales la viabilidad celular fue del 92%. Se observó que existen diferencias evidentes en cuanto al número y el grado de daño de las células, pertenecientes a las muestras de tejido de los peces provenientes de cada sistema lagunar, y entre las épocas del año examinadas ($p < 0.05$). En todos los casos, los organismos provenientes de las tres lagunas presentaron durante la tem-

Tabla 5. Correlación (r) entre el daño genético (longitud de la cauda) en leucocitos de lisa (*Mugil cephalus*) y los niveles de contaminantes registrados en las muestras de sedimentos de las lagunas de Pueblo Viejo, Tamiahua y Tampamachoco.

Laguna	Cadmio	Cromo	Plomo	HPA's
Pueblo Viejo	0.9891*	0.9692*	0.1236	-0.0340
Tamiahua	0.8457*	0.4007	0.4660	0.2210
Tampamachoco	-0.3865	-0.6761	-0.8505	0.9999*

* Relación significativa ($p < 0.05$).

porada de lluvias el número más elevado de células con efecto deletéreo. Los organismos que mostraron el mayor porcentaje con células dañadas (60%) fueron los colectados en la laguna de Tampamachoco, con caudas de hasta 275 μm de longitud. En los ostiones provenientes de la laguna de Pueblo Viejo se detectó un 43% de células dañadas y cometas con tamaños de hasta 215 μm . Asimismo en los especímenes procedentes de Tamiahua se registró el menor número de células con daño (37%) con cometas de 100 μm (Tabla 6). Durante la época de secas, los organismos de Tampamachoco presentaron un 49% (262 μm) de células con daño, los de Pueblo Viejo un 31% (73 μm) y los de Tamiahua 18% (70 μm) (Tabla 6). De manera global, el daño observado en el tejido branquial de los ostiones, procedentes de las lagunas fue (de mayor a menor grado de daño): Tampamachoco > Pueblo Viejo > Tamiahua.

Tabla 6. Daño genético en células de branquia de ostión (*Crassostrea virginica*) colectados en las lagunas de Pueblo Viejo, Tamiahua y Tampamachoco durante las épocas de secas (1994) y de lluvias (1994).

Epoca del Año	Laguna	Número de Organismos	Células sin cauda %	Células con cauda %	Longitud de la cauda μm
Secas	Pueblo Viejo	8	69	31 ^{a1}	73 \pm 42.1 ^{a1}
	Tamiahua	12	82	18 ^{b1}	70 \pm 18.5 ^{a1}
	Tamapmachoco	5	51	49 ^{c1}	262 \pm 32.1 ^{b1}
Lluvias	Pueblo Viejo	10	57	43 ^{a2}	215 \pm 32.1 ^{a2}
	Tamiahua	12	63	37 ^{a2}	100 \pm 21.6 ^{b1}
	Tamapmachoco	5	40	60 ^{b2}	275 \pm 73.4 ^{a1}

Distintas letras denotan diferencias significativas entre lagunas en una misma época ($p < 0.05$).
Distintos números denotan diferencias significativas entre épocas para una laguna ($p < 0.05$).

El análisis de correlación se realizó reuniendo todos los datos de las lagunas y de las épocas de año (debido a que no se contó con datos suficientes) y reveló que existen relaciones significativas ($p < 0.05$) entre el grado de daño genético registrado en las muestras de branquia de ostión y los niveles de HPAs presentes en los sedimentos de las lagunas costeras bajo estudio (Tabla 7).

Tabla 7. Correlación (r) entre el daño genético (longitud de la cauda) en células de la branquia de ostión (*Crassostrea virginica*) y los niveles de contaminantes registrados en las muestras de sedimentos de las lagunas de Pueblo Viejo, Tamiahua y Tampamachoco.

Cadmio	Cromo	Plomo	HPA's
-0.2948	-0.7654	-0.055	0.5415 *

* Relación significativa ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Para determinar el nivel de riesgo y/o la condición de salud de las especies o de un sistema, actualmente se requiere de conjuntar los análisis físicos y químicos de las muestras ambientales con pruebas biológicas que permitan a través de la evaluación de diversas respuestas de los organismos establecer relaciones causales con la concentración de los contaminantes en el medio en que se encuentran (Forbes y Forbes, 1996). En el presente estudio, se utilizaron dos ensayos rápidos para detectar la presencia y los efectos de compuestos de acción genotóxica.

El SOS Chromotest es una prueba más sensible que el ensayo de AMES para detectar la presencia de genotóxicos en extractos de sedimentos (Bombardier *et al.*, 2001). Esta prueba permitió detectar la presencia a lo largo del año de compuestos deletéreos en 10 muestras de agua, de las cuales 3 fueron colectadas en la laguna de Pueblo Viejo, en los lugares conocidos como Barranco Amarillo, Tamacuil y La Tapada. Los dos primeros sitios de estudio reciben influencia de los ríos Pánuco y Tamacuil que descargan en esta laguna (Márquez *et al.*, 1994) por lo que es probable que éstas corrientes aporten compuestos tóxicos al sistema. Por otro lado, el sitio La Tapada se encuentra cercano a un corredor industrial y una cementera, por lo que es factible que éstas sean las fuentes de los compuestos detectados.

En la laguna de Tamiahua, las sustancias con efecto sobre el material genético se detectaron a lo largo del año, en las aguas de 5 localidades: Punta Mangle, La Laja, Isla del Toro, boca del río Cucharas y boca del estero Tancochín. Punta mangle es un sitio cercano a la Boca de

Tampachiche (norte), donde existe tráfico continuo de embarcaciones. La Laja y la boca del río Cucharas son esteros que desembocan en la laguna, en cuyos márgenes existen asentamientos humanos y tráfico continuo de embarcaciones menores, mientras que la Isla del Toro existen asentamientos humanos, pastizales para ganado e incluso una pista de aterrizaje de avionetas (lancheros de la región com. per.).

Por otro lado, en la laguna de Tampamachoco, la presencia de compuestos con acción genotóxica en las muestras de agua colectadas en las localidades de La Paloma y el Paso Daniel, podrían asociarse con la cercanía de estos sitios a la planta generadora de energía eléctrica (termoeléctrica) operada por la CFE.

En las tres épocas de colecta (secas, lluvias y nortes), se detectó la presencia de sustancias genotóxicas en las muestras de sedimentos provenientes de 6 localidades: Barranco amarillo (Pueblo Viejo); Punta Mangle, Cabo Rojito, boca del río Cucharas, estero Tancochín (Tamiahua) y La Paloma (Tampamachoco). Es probable que éstos sitios funcionen como trampas de compuestos tóxicos considerando las características de los sedimentos en estas zonas, el cual varía de limos a arcillas (Marquez *et al.*, 1994), lugares que se consideran como de riesgo para la realización de actividades como el cultivo de organismos, pesca o recreación (EAA, 1977). Si bien los sistemas costeros presentan procesos de autodepuración o lavado durante la época de lluvias (Fergusson, 1990; Van Leeuwen, 1995), este efecto se observó en el presente estudio sólo en las localidades Mono Verde (Pueblo

Viejo), barra de la boca (Tamiahua) y Estero Jacome (Tampamachoco), donde la presencia de compuestos adversos al material genético se observó en secas pero no en lluvias sugiriendo la dilución de las sustancias. Por otro lado, la presencia de compuestos nocivos se observó sólo en la época de lluvias en las localidades de La Tapada (Pueblo Viejo) y Dos Canales (Tampamachoco), lo que podría indicar el arrastre de tóxicos a estos lugares durante esta estación del año.

En el sistema de Pueblo Viejo en la localidad conocida como Barranco Amarillo, el tipo de sedimento predominante es limo-arcilloso y recibe además la influencia de los ríos que alimentan este sistema (el río Pánuco y el río Tamacuil) (Márquez *et al.*, 1994); de tal manera, es probable que éstas corrientes sean las responsables de la introducción de compuestos xenobióticos a la zona, en la que se detectó las concentraciones más elevadas de cromo y plomo (54.9 y 58.61 mg/g respectivamente) del cuerpo lagunar (Botello, 1995). Los resultados obtenidos en Pueblo Viejo sugieren que a lo largo del año, los xenobióticos responsables de la acción dañina sobre el ADN en *Escherichia coli* fueron los metales plomo y cromo mientras que en el tejido de branquia de *Mugil cephalus* son en particular el cadmio y cromo, donde para ambas especies, los niveles de HPAs registrados en sedimentos no ejercen acción genotóxica.

En la laguna de Tamiahua se detectaron compuestos genotóxicos en la boca norte, la zona cercana a la barra y la boca del río Cucharas, localidades con sedimentos conformados por arenas finas y arenas finas-arcillosas (Márquez *et al.*, 1994); a su vez, la zona frente a la boca de Cucharas no presenta circulación evidente durante el año (Márquez *et al.*, 1994) lo cual podría relacionarse con una mayor deposición de sustancias tóxicas, las cuales son resuspendidas durante la época de nortes por los fuertes vientos y lluvias torrenciales característicos de la temporada (Contreras, 1988).

En los sedimentos que presentaron efectos adversos, se registraron concentraciones de metales pesados tales como Cd, Cr, Pb por arriba de los límites máximos permisibles por la ley (Botello, 1995) y se detectaron compuestos carcinógenos en ellos (Botello y Calva, 1998).

Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos del análisis de correlación múltiple entre la respuesta de *E. coli* y los niveles de xenobióticos, siendo evidente la relación significativa entre la genotoxicidad y los niveles de HPAs en la temporadas de secas, los niveles de cadmio en lluvias y la mezcla de cromo, plomo y HPAs en nortes. No obstante, la relación directa entre el daño en el ADN en el tejido de branquia de *M. cephalus* se asoció sólo a la presencia de cadmio en los sedimentos.

En la laguna de Tampamachoco se observaron sedimentos con actividad genotóxica en la localidad cercana a la termoeléctrica (La Paloma) y las ubicadas al Oeste (Paso Daniel) y en la porción Norte de éste sistema (Dos Bocas). En estos sitios el tipo de sedimento es arena lodosa y lodos (Márquez *et al.*, 1994). De acuerdo al análisis de correlación múltiple realizado, la genotoxicidad de los sedimentos de estos lugares se atribuyó a la presencia de los metales cadmio, plomo y de los HPAs durante la temporada de secas, mientras que en lluvias y nortes se asoció exclusivamente a los niveles de HPAs. De igual modo, se observó una relación directa entre el daño detectado en la branquia de *M. cephalus* y los niveles de HPAs. Cabe mencionar que en este sistema se registró la concentración más elevada de HPAs (9.39 ppm) en la localidad de La Paloma (frente a la termoeléctrica), en comparación a la detectada en las otras 2 lagunas (Botello y Calva 1998).

Cabe mencionar que las muestras que presentaron efecto genotóxico fueron en su mayoría las que se trataron con la fracción S-9 (con activación metabólica) lo cual indica que los compuestos responsables de este efecto podrían ser hidrocarburos aromáticos, ya que los metabolitos producto del proceso de biotransformación de estos compuestos son genotóxicos (Albert *et al.*, 1988; Dreisbach y Robertson, 1998; Bombardier *et al.*, 2001). Los HPAs no son compuestos naturales sino producidos como resultado de actividades antropogénicas, principalmente por quema de combustibles fósiles (Botello y Calva 1998). Sin embargo los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la acción genotóxica está también asociada a la presencia de algunos metales pesados (Cd, Cr y Pb). En este sentido, en la laguna de Pueblo Viejo, los compuestos con acción so-

bre el material genético se relacionaron con la presencia de metales en los sedimentos (Cr y Pb); en la laguna de Tamiahua éstos se asociaron con una mezcla de HPAs y metales (Cd, Cr y Pb), en tanto que para la laguna de Tampamachoco los HPAs son en mayor proporción los responsables de la acción genotóxica de los sedimentos.

Los estudios de tipo integral donde se determinan los niveles de contaminantes presentes en los sedimentos así como su efecto sobre los organismos, aportan información para determinar la calidad ambiental. La calidad ambiental se puede definir como el estado de "salud" del ecosistema y cuyo establecimiento tiene como objeto la protección de los sistemas, ya que se puede inferir su grado de deterioro, las posibles causas que lo originan y proponer medidas adecuadas para mitigar los efectos negativos (Chapman, 1988; Del Valls, 1998).

Investigaciones realizadas con organismos acuáticos (vertebrados e invertebrados) demuestran que el Ensayo Cometa es una herramienta confiable en los estudios de biomonitorio (Verschaeve y Van Gora, 1999; Cox, 2001; Lee y Steinert, 2003). La Prueba o Ensayo Cometa (Electroforesis unicelular) es un método que permite evaluar la integridad del material genético, integridad que es fundamental para las funciones y la supervivencia de los organismos (Lee y Steinert, 2003) y por lo tanto para la estabilidad de las poblaciones.

En este estudio se utilizó el Ensayo Cometa para evaluar el efecto de los genotóxicos presentes en las lagunas bajo estudio sobre 2 especies: el pez lisa (*Mugil cephalus*) y en el ostión (*Crassostrea virginica*), considerado este último como organismo centinela (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1991; Botello *et al.*, 1992; 1994; Villanueva y Botello, 1998). Los resultados del análisis de la integridad genética en los leucocitos de lisa (*Mugil cephalus*) indicaron que los organismos con mayor daño en sus leucocitos (proporción de células con cauda y longitud de la cauda) fueron los peces de la laguna de Tampamachoco, seguidos por los de Pueblo Viejo y por último los de Tamiahua. Este comportamiento es similar al observado en el tejido de branquia de ostión, donde el grado de daño genético observado fue (de mayor a me-

nor daño): Tampamachoco > Pueblo Viejo > Tamiahua.

Los resultados anteriores coinciden con los niveles de contaminantes registrados en los sitios donde se colectaron los organismos, ya que en los tres sistemas de estudio éstos difieren. En la laguna de Tampamachoco se observó una relación directa entre los niveles de HPAs y el daño genético detectado en el tejido de branquia de *Mugil cephalus*. Resultados similares fueron observados por Kammann *et al.* (2001) en células de *Cyprinus carpio*, expuestas a sedimentos contaminados con HPAs. En contraste, en las lagunas de Pueblo Viejo y Tamiahua, el daño genético observado en los leucocitos de *Mugil cephalus* se correlacionó con la presencia de metales; en Pueblo Viejo con el Cadmio y el Cromo mientras que en Tamiahua, exclusivamente con el Cadmio. Un hecho similar es reportado por Tuck (1999) quién observó un efecto deletéreo en células de *Daphnia magna* expuestas a los metales Cd y Cu, siendo mayor el efecto en los organismos expuestos a Cd.

No obstante, en *Crassostrea virginica* el daño genético en las células branquiales se asoció exclusivamente con los niveles de HPAs en sedimentos. Nuestros resultados contrastan con lo reportado por Aruski y Dixon, (2002) quienes observaron un efecto genotóxico sinérgico entre el Cd y xenobióticos como el antraceno, benceno y H₂O₂ en células de branquia de *Mytillus edulis*.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la evaluación del daño genético a nivel celular es un biomarcador confiable para detectar efectos adversos en los organismos debidos al efecto de contaminantes y, constituye una herramienta confiable para la evaluación de salud ambiental.

A partir de la integración de los resultados obtenidos por las pruebas de detección de compuestos genotóxicos en sedimentos (SOS Chromotest), de la evaluación del efecto genotóxico de los sedimentos a nivel celular (Ensayo Cometa) y su relación con la concentración de los tóxicos en los sedimentos, es evidente que la calidad ambiental de las lagunas fue (de mayor a menor calidad): Tamiahua > Pueblo Viejo

> Tampamachoco. Asimismo, los resultados sugieren que fundamentalmente los HPAs en la laguna de Tampamachoco, los metales Pb y Cr en la laguna de Pueblo Viejo y la mezcla de los metales Cd, Cr, Pb y HPAs en la laguna de Tamiahua podrían ser considerados como contaminantes críticos en éstos sistemas.

Es importante plantear medidas para evitar que aumente el grado de deterioro de estos sistemas, controlando las descargas, para evitar a mediano y largo plazo daños irreversibles en la calidad del ambiente y en las poblaciones naturales.

LITERATURA CITADA

- Albert, A.L. y L.S. Osorio, 1988.** La Toxicología en México. Estado Actual y Perspectivas. Sociedad Mexicana de Toxicología. México. 210 p.
- Amalacher, H., 1961.** Textbook of Fish Diseases. TFH Publications New Jersey. 234 p.
- ASTM, 1994.** Standard guide for collection, storage, characterization and manipulation of sediments for toxicological testing. Philadelphia. 21 p.
- Bombardier M., N. Bermingham, R. Legault, y A. Fouquet, 2001.** Evaluation of an SOS-Chromotest based approach for the isolation and detection of sediment associated genotoxins. *Chemosphere*, 42(8): 31-944
- Botello, V. A., V.G. Ponce, A. Toledo, G. Díaz, y S. Villanueva, 1992.** Ecología recursos costeros y contaminación en el Golfo de México, p. 28-48. *Ciencia y Desarrollo*: 28-48.
- Botello, A.V., G. Ponce-Velez, S. Villanueva-Fragozo, y L.Q. Rueda, 1994.** Contaminación, p. 445-470. *In: G. De la Lanza-Espino y C. Cáceres Martínez. (Eds.) Lagunas Costeras y el Litoral Mexicano. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S., 567 p.*
- Botello, A. V., 1995.** Contaminación por hidrocarburos y metales pesados. p. 27-29; 215-230. *In: A. Botello (Responsable) Evaluación Geoquímica Ambiental y Diagnóstico de la Zona Costera de Veracruz: Lagunas de Tamiahua, Pueblo Viejo y Tampamachoco. Informe final de Proyecto de Investigación CONACYT 3232-T9308. 345 p.*
- Botello, A.V., y L.G. Calva, 1998.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Pueblo Viejo, Tamiahua and Tampamachoco lagoons in the Southern Gulf of México. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60: 96-103
- Cárdenas S.A., B.L. Mendez, y C. Ramírez, 1990.** Estudio preliminar de algunos aspectos biológicos y de contaminación para las especies *Mugil curema* (Valenciennes) *Cathorops melanopus* (Gunther) y *Brevoortia patronus* (Goode) (Pisces Teleostei) en la Laguna de Pueblo Viejo, Veracruz. Tesis Profesional. ENEP-Zaragoza. UNAM México. 112 p.
- Contreras, F., 1988.** Las Lagunas Costeras Mexicanas. 2da Edición. Centro de Ecodesarrollo. México 263 p.
- Cox J., R.L. Hess, J.M. Bettega, C.M. Simões, y C.R. Barardi, 2001.** Use of the comet assay for detection of DNA damage in oyster hemocytes from *Crassostrea gigas* exposed in vivo to stressors. *Virus Review Response*, 6 (2): 17-22
- Chapman, A.M., 1988.** Marine sediment toxicity test. p 391-402. *In: J.J. Lichtenberg, C.I. Winter and L. Fradkin (Eds.). Chemical and Biological Characterization of Sludges, Sediments Dredge Soils and Drilling Fluids. STA. 976 ASTM Philadelphia A.A. 587 p.*
- Del Valls, T.A., J.M. Forja, y A. Gomez-Parra, 1998.** An integrative assessment of sediment quality in littoral ecosystems from the Gulf of Cadiz. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(6): 1073-1084
- Dreisbach, R.H., y W. O. Robertson, 1998.** Manual de Toxicología Clínica. 7 Ed. Manual Moderno. México. 560 p.
- EPA, 1977.** Implementation Manual for Section 103 of Public Law 92-532: Marine Protection Research and Sanctuaries Act of 1972. US Army Corps of Engineers Environmental effects Laboratory, Waterways experiment Section, Vickburg, M.S. 43 p.
- Ewers U., y H.W. Schlikoter, 1991.** Lead, p 971-1014. *In: E. Merian (Ed.) Metals and their Compounds in the Environment. VCH Weinheim. New York. 1567 p.*
- Fergusson, J.E., 1990.** The Heavy Elements Chemistry, Environmental Impact and Health Effects. Pergamon Press. Oxford. 615 p.
- Forbes V. E., y T.L. Forbes, 1994.** Ecotoxicology in Theory and Practice. Chapman and Hall. London. 243 p.
- Gaughhofer, J., y V. Bianchi, 1991.** Chromium. p. 854-876. *In: E. Merian (Ed.) Metals and their Compounds in the Environment. VCH Weinheim. 1567 p.*

- Lee F.R., y S. Steinert, 2003.** Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544: 43-64
- Kammann, U., M. Bunke, H. Steinhart, y N. Theobald, 2001.** A permanent fish cell line (EAC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutation Research*, 498: 67-77
- Kwan, K.K., y B.J. Dutka, 1990.** Simple two-step sediment extraction procedure for use in genotoxicity and toxicity bioassays. *Toxicology Assessment*, 5: 395-404
- Kruijf, H.A.M., 1988.** Classification of compounds. p. 129-143. In: H.A.M. Kruijf y D. Zwart (Ed) Manual on Aquatic Ecotoxicology. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 289 p.
- Maron M.D., y B.N. Ames, 1983.** Revised methods for the *Salmonella mutagenicity* Test. *Mutation Research*, 113: 173-215
- Márquez A. Z., 1994.** Geología y Sedimentación. p. 29-44. In: A. Botello (Responsable) Evaluación geoquímica ambiental y diagnosis de la zona costera de Veracruz: Lagunas de Tamiahua, Pueblo Viejo y Tampamachoco. Informe final de Proyecto de Investigación CONACYT 3232-T9308. 345 p.
- Moore, W., 1991.** Inorganic Contaminants of Surface Water. Springer-Verlag. New York. 334 p
- Pérez Hernández M. A., F. Contreras, E. Ducoing, y A. García, 1994.** Ictiofauna, hidrología, productividad y algunos parámetros de contaminación de la Laguna de Tampamachoco Ver. Informe Final del Proyecto de Investigación Interdepartamental División C.B.S. UAMI. 234 p.
- Pruski, A.M., y D. R. Dixon, 2002.** Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquatic Toxicology*, 57:127-37
- Quillardet, A., y M. Hofnung, 1993.** The SOS Chromotest: a review. *Mutation Research*, 297:235-279
- Ramade, F., 1989.** The pollution of the hydrosphere by global contaminants and its effects on aquatic ecosystems. p. 152-183. In: A. Boudou and F. Rybeyre (Eds.). Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies. CRC Press Inc. Boca Raton. Florida. 345 p.
- Rosales, M.T.L., A.V. Botello, y E.F. Mandelli, 1979.** PCB's and organochlorine insecticides in oysters from coastal lagoon of the Gulf of Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 21: 652-656
- Rosas, I., A. Baez, y R. Belmont, 1983.** Oyster *Crasostrea virginica* as indicator of heavy metal pollution in some Lagoons of the Gulf of Mexico. *Water, Air and Soil Pollution*, 20: 127-135.
- Secretaria de Pesca, 1998.** Anuario Estadístico de Pesca 1997. México. 231 p.
- Singh, N.A., D.B. Banner, R.R. Tice, y E.L. Schneider, 1988.** A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 84:123-130
- Stoeppler, M., 1991.** Cadmium. p. 803-852. In: E. Merian (Ed.) Metals and their Compounds in the Environment. VCH Weinheim. 1567 p.
- Tice, R.R., 1995.** The single cell gel Comet assay. p. 315-339. In: D.H. Ahillis and S. Venitt (Eds.) Environmental Mutagenesis. Bios Scientific Publishers LTD Oxford, U.K. 541 p.
- Tuk, C.W., 1999.** Use of the comet assay in *Daphnia magna* after in vivo exposure to chemicals. *Comet Newsletter*, 9: 2-4
- USEPA, 1982.** Sampling protocols for collecting surface water, bed sediment, bivalve and fish for priority pollutants analysis. Washington D.C. 109 p.
- Van Leeuwen, C.J., 1995.** Ecotoxicological effects. p. 175-237. In: C. Van Leeuwen (Ed.) Risk Assessment of Chemicals. Kluwer Academic Publishers. Boston. 423 p.
- Verschaeve, U., y L. Van Gora, 1999.** The alkaline comet assay in oysters. *Comet Newsletter*, 9: 8-10
- Villanueva, S.F., y A.V. Botello, 1998.** Metal pollution in coastal areas of Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 157: 53-94
- Zar, J.H., 1996.** Biostatistical Analysis. Prentice Hall. New Jersey. 662 p

