



Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

Identificación de biomarcadores moleculares de exposición crónica a hidrocarburos en el crustáceo de agua dulce *Hyaella curvispina* como herramientas para la evaluación ambiental en zonas de explotación hidrocarburífera

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Biología

Autora: Josefina del Brio

Director: Dr. Andrés Venturino

Co-directora: Dra. Cristina Mónica Montagna

Año 2018

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Comahue, Facultad de Ingeniería, Facultad de Ciencias Agrarias y al Centro Regional Universitario Bariloche.

A CITAAC por ofrecerme el espacio y equipamiento necesario para desarrollar mi tesis.

A CONICET e YPF por otorgarme la beca para realizar mi doctorado.

Agradezco a mi director, Andrés Venturino por haberme brindado la oportunidad de realizar mi posgrado y por todos sus aportes a la tesis.

A mi co-directora Mónica Montagna, por integrarme en su grupo de investigación y su continua dedicación y predisposición en el desarrollo de este trabajo. Por ser tan generosa, por sus valiosos consejos y por todos los lindos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio, Laura, Jime, Vale, Nati P., Nati G., Maru, Seba, Vicky, Marian, Sole, Julia, Enrique, Piuqué, Eli, Flavia y Vir, por su compañerismo, sus aportes y por los momentos compartidos.

Un especial agradecimiento a Gustavo Giménez, por su valiosa ayuda en estadística y a Mario Martínez, por su colaboración en los trabajos de laboratorio realizados en la Facultad de Ciencias Agrarias. También a Mercedes Indaco, por su contribución en los análisis químicos.

A Aye, por estar siempre presente y por su ayuda en la elaboración de los mapas.

A Betsy, con quien iniciamos nuestros primeros pasos en la investigación, le agradezco su ayuda continua, compañía y amistad.

A mi tía Mariela, por los viajes compartidos y las infinitas esperas cuando los experimentos demoraban más de lo que debían.

Un especial agradecimiento a mi familia. A mi papá, por enseñarme los valores de la perseverancia y el esfuerzo para lograr mis objetivos. A mi mamá, por inculcarme la importancia del estudio, su amor incondicional y porque sin lugar a dudas, es la persona más especial de este mundo. A Ignacio y a mis hermanas, Lola y Valentina, por acompañarme cada día y por su cariño continuo. A mis sobrinos, por iluminarme mis días.

Por último, deseo agradecer a Martín, mi compañero de vida, por su amor incondicional y ayuda en todo momento.

DEDICATORIA

A mi abuela Lila, una de las mujeres más importantes de mi vida.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	8
ABSTRACT	10
ABREVIATURAS	12
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Composición y características del petróleo.....	16
1.2. Clasificación del petróleo.....	17
1.3. Dinámica de los hidrocarburos de petróleo en el medio ambiente	18
1.4. Sitio y mecanismo de acción.....	21
1.5. Efectos de los hidrocarburos	21
1.5.1. Efectos a nivel individual	24
1.5.2. Efectos en las poblaciones	28
1.5.3. Efectos en las comunidades	30
1.6. Mecanismos bioquímicos de defensa.....	31
1.6.1. Enzimas de oxidación y reducción	33
1.6.2. Enzimas de conjugación	35
1.6.3. Enzimas hidrolíticas	37
1.6.4. Compuestos antioxidantes no enzimáticos	38
1.7. Biomarcadores	40
1.8. <i>Hyalella curvispina</i> como especie modelo en estudios toxicológicos.....	42
1.8.1. Clasificación sistemática	43
1.8.2. Distribución geográfica y hábitat	43
1.8.3. Biología	44
1.9. Actividad hidrocarburífera en la región	45
2. HIPÓTESIS	48
3. OBJETIVOS	49
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51

4.1. Reactivos utilizados	51
4.2. Preparación de la Fracción Acomodada en Agua de Petróleo (WAF)	52
4.3. Área de estudio.....	53
4.3.1. Recolección de muestras de agua y sedimentos	55
4.3.1.1. Determinación del porcentaje de humedad en muestras de sedimentos .	55
4.3.1.2. Determinación de materia orgánica en muestras de sedimentos.....	55
4.3.2. Organismos.....	56
4.4. Métodos analíticos	57
4.4.1. Hidrocarburos	57
4.4.2. Plaguicidas.....	58
4.4.2.1. Organoclorados y Piretroides.....	58
4.4.2.2. Organofosforados y Carbamatos.....	58
4.5. Disipación de los componentes de la WAF	59
4.6. Bioensayos	60
4.6.1. Exposición a concentraciones subletales de WAF	62
4.7. Estudios bioquímicos	62
4.7.1. Preparación de homogenados de <i>H. curvispina</i>	62
4.7.2. Contenido de glutatión reducido.....	63
4.7.3. Actividad glutatión S-transferasa	63
4.7.4. Actividad catalasa.....	64
4.7.5. Actividad citocromo P450.....	64
4.7.6. Caracterización cualitativa de esterasas. Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida	65
4.7.7. Determinación de la concentración de proteínas	65
4.8. Estudios moleculares.....	66
4.8.1. Análisis de la expresión de ARN por reacción en cadena de la polimerasa..	66
4.8.1.1. Extracción de ARN	66

4.8.1.2. Verificación de la integridad del ARN extraído	67
4.8.1.3. Retrotranscripción.....	67
4.8.1.4. Cebadores.....	67
4.8.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	68
4.9. Distribución de sensibilidad de especies.....	68
4.10. Análisis estadísticos	69
5. RESULTADOS.....	71
5.1. Análisis de la composición y disipación de la WAF en el tiempo.....	71
5.2. Caracterización físico-química de los sitios de muestreo	74
5.3. Bioensayos	76
5.4. Estudios bioquímicos	80
5.4.1. Contenido de glutatión reducido.....	80
5.4.2. Actividad glutatión S-transferasa	82
5.4.3. Actividad catalasa.....	84
5.4.4. Actividad citocromo P450	86
5.4.5. Caracterización cualitativa de esterasas. Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida	89
5.4.6. Análisis multivariado del comportamiento de los parámetros bioquímicos en las dos poblaciones	90
5.5. Estudios moleculares.....	93
5.5.1. Verificación de la integridad del ARN extraído.....	93
5.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	93
5.6. Distribución de sensibilidad de especies.....	94
6. DISCUSIÓN.....	98
6.1. Análisis de la composición y disipación de la WAF en el tiempo.....	98
6.2. Caracterización físico-química de los sitios de muestreo	99
6.3. Estudios toxicológicos	102
6.4. Efectos subletales de WAF en <i>H. curvispina</i>	105

7. CONCLUSIONES.....	113
8. BIBLIOGRAFÍA.....	116
9. TRABAJO CIENTÍFICO.....	142

RESUMEN

El petróleo crudo es una mezcla compleja de hidrocarburos alifáticos y aromáticos con cantidades variables de azufre, nitrógeno, oxígeno y trazas de metales como níquel, vanadio y cromo. La demanda de hidrocarburos de petróleo crudo genera preocupación mundial debido a la contaminación, especialmente en ecosistemas acuáticos. Estudios sobre contaminación con petróleo crudo han revelado que su toxicidad es causada principalmente por la fracción acomodada en agua de petróleo (WAF). Al igual que con otros xenobióticos, los efectos tóxicos de la WAF en los organismos se manifiestan primero a nivel bioquímico-molecular y luego se transmiten a los siguientes niveles de organización biológica. Entre los organismos bentónicos de agua dulce, los anfípodos *Hyalella curvispina* son considerados importantes bioindicadores de la calidad del ecosistema acuático por su sensibilidad a diferentes xenobióticos. La explotación de los recursos energéticos es la principal actividad económica en la provincia de Neuquén. A pesar de las regulaciones y programas de monitoreo, se han detectado hidrocarburos de petróleo, como naftaleno y pireno, en muestras de agua y sedimentos de diferentes sitios de Neuquén. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron (i) caracterizar la composición de hidrocarburos de WAF y su disipación en el tiempo (ii) evaluar los efectos subletales producidos por la exposición a WAF en dos poblaciones de *H. curvispina*.

La WAF se obtuvo a partir de petróleo crudo extraído del pozo Chachahuen, ubicado en la cuenca neuquina. Se trabajó con anfípodos de *H. curvispina* colectados en el lago Los Barreales (LB) y Arroyo Durán (AD), éste último con antecedentes de contaminación por hidrocarburos. Se evaluó el efecto de la exposición a 0,0014 mg/L y 0,35 mg/L de WAF durante 6, 24 y 48 h en el contenido de glutatión (GSH), y las actividades enzimáticas de glutatión S-transferasa (GST), catalasa (CAT) y citocromo P450 monooxigenasa (CYP450).

La concentración total de hidrocarburos en la WAF fue de 2,50 mg/L y sus principales componentes fueron C9-C36 n-alcános (TPHs). En menor proporción se determinaron hidrocarburos aromáticos de un solo anillo (BTEX) y bajas concentraciones de hidrocarburos poliaromáticos (PAHs), particularmente naftaleno.

Se ajustaron modelos exponenciales simples a los datos de disipación de cada componente de WAF. El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de los TPHs fue 71 ± 32 h. Los $t_{1/2}$ estimados para tolueno (65 ± 11 h), benceno (76 ± 16 h) y etilbenceno (88 ± 19 h) fueron menores que el $t_{1/2}$ de m- y p-xileno (128 ± 25 h) y el o-xileno (217 ± 45 h), éste último significativamente diferente de los otros componentes. El $t_{1/2}$ de naftaleno no fue estimado dado que a las 6 h su concentración estaba por debajo de los límites de detección.

Las muestras de LB y AD mostraron valores de temperatura y pH similares. La conductividad eléctrica en AD fue aproximadamente 7 veces mayor que en LB, mientras que el oxígeno disuelto fue menor. La concentración de hidrocarburos en sedimentos fue 27 veces mayor en AD respecto a la determinada en LB, indicando que el área estaba muy contaminada con n-alcános. Sólo se determinaron hidrocarburos en las muestras de agua del sitio AD. Las concentraciones de BTEX y PAHs estuvieron bajo los niveles de detección en ambos sitios. Tanto en las muestras de agua como de sedimentos de AD, las concentraciones de plaguicidas analizados estuvieron bajo los niveles de detección.

La toxicidad aguda y crónica a WAF en anfípodos de LB fue de 0,33 mg/L y 0,018 mg/L, respectivamente. Por otro lado, no se registró mortalidad de anfípodos recolectados en AD tanto en exposiciones agudas como en crónicas a WAF (2,50 mg/L).

Los anfípodos provenientes de AD presentaron, respecto a los organismos de LB, una significativa disminución en el contenido de GSH y en la actividad basal GST y un

significativo aumento en actividad CAT y CYP450. La respuesta a la exposición a WAF fue diferente en ambas poblaciones. En anfípodos provenientes de LB, tanto el contenido de GSH como la actividad de CAT y CYP450 aumentaron en forma significativa a su respectivo control en todos los tiempos de exposición a WAF evaluados. Por otro lado, la actividad GST en esta población disminuyó de forma significativa luego de 24 y 48 h de exposición a WAF. En la población AD se observó un aumento significativo en el contenido de GSH a las 6 h de exposición a WAF. Por el contrario, la actividad CAT disminuyó en forma significativa a las 24 h de exposición y las actividades GST y CYP450 no mostraron diferencias significativas respecto a su control en ninguno de los tiempos de exposición. El análisis de la distribución de frecuencias de la actividad CYP450 mostró que el 100% de los anfípodos de AD presentaron actividades superiores al intervalo de confianza superior de la media (IC95%) de LB. Diferentes isoformas de esterasas (EST) fueron identificadas en anfípodos de las poblaciones AD y LB. A través de estudios moleculares se amplificaron fragmentos de alrededor de 710 pb del gen CYP450 en anfípodos de LB controles y expuestos a WAF.

A partir de la curva de distribución de sensibilidad de especies (SSD) a WAF en organismos acuáticos se determinó que 0,46 mg/L afectaría al 10% de las especies acuáticas, incluidos los anfípodos de LB.

Los resultados de este trabajo de tesis señalan que los $t_{1/2}$ de los componentes de WAF preparada con petróleo de la región variaron entre 65-200 h. El valor de 96 h-CL50 de *H. curvispina* de LB, comprendido dentro del percentil 10 estimado a partir de la SSD, indica su alta susceptibilidad a WAF. Sin embargo, la ocurrencia de tolerancia a WAF en los anfípodos de AD indicaría su capacidad de adaptación a ambientes contaminados a través del aumento de actividad del sistema de detoxificación. Los parámetros bioquímicos estudiados podrían ser utilizados como biomarcadores de contaminación por petróleo. La SSD permitió establecer niveles de referencia de toxicidad para WAF.

ABSTRACT

Crude oil is a complex mixture of aliphatic and aromatic hydrocarbons along with varying amounts of sulfur, nitrogen, oxygen and trace metals such as nickel, vanadium and chromium. Demand of crude oil hydrocarbons causes a growing global concern due to pollution, especially in aquatic ecosystems. Toxicological research of crude oil contamination has revealed that its toxicity is mainly caused by the water-accommodated fraction (WAF). Like other xenobiotics, WAF toxic effects are first shown in organisms at biochemical-molecular level and then transmitted to the following biological levels of organization. Among freshwater benthic organisms, amphipods of the species *Hyalella curvispina* are considered important bioindicators of aquatic ecosystem quality due to their sensitivity to different xenobiotics.

Exploitation of energy resources is the main economic activity at Neuquén province. Despite regulations and monitoring programs, petroleum hydrocarbons, such as naphthalene and pyrene, have been detected in water and sediment samples from different sites of Neuquén province. Thus, the objectives of this work were to: (i) characterize the hydrocarbons composition of WAF and its dissipation over time; (ii) evaluate the sublethal effects of two *H. curvispina* populations to WAF exposure.

The WAF was obtained from crude oil extracted from Chachahuen field, located in Neuquén and the research was carried out using *H. curvispina* organisms collected in Los Barreales (LB) lake, and in Duran Stream (DS). Oil pollution has been reported in DS previously. The effects of WAF exposure at 0,0014 mg/L and 0,35 mg/L during 6, 24 and 48 h were evaluated in the glutathione content (GSH) and the enzymatic activities of glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and cytochrome P450 monooxygenase (CYP450).

The total hydrocarbon concentration in WAF was 2,50 mg/L, and it was mainly composed of C9–C36 n-alkanes (TPHs). Other compounds found were single-ring aromatic hydrocarbons (BTEX) and low concentrations of polyaromatic hydrocarbons (PAHs), particularly naphthalene. Simple exponential models were fitted using the dissipation data for each WAF component. The estimated half-life time ($t_{1/2}$) of TPHs was 71 ± 32 h. The estimated $t_{1/2}$ of toluene (65 ± 11 h), benzene (76 ± 16 h) and ethylbenzene (88 ± 19 h) was lower than p-xylene (128 ± 25 h) and o-xylene (217 ± 45 h). The last one was significantly different from the other components. Particularly, naphthalene $t_{1/2}$ could not be estimated because the concentration was below the detection limits in the first 6 h.

Samples from LB and DS sites showed similar values of pH and temperature. Electrical conductivity in DS was approximately 7 times higher than in LB, while the dissolved oxygen was lower. The sediment concentration of hydrocarbons at DS was 27 times higher than the one at LB, showing that DS area was heavily contaminated with n-alkanes. Hydrocarbons were only determined in DS water samples. Concentrations of BTEX and PAHs were below the detection levels in both sites. Pesticides concentrations in DS were below detection levels in both water and sediment samples.

Acute and chronic toxicity to WAF were 0.33 mg/L and 0.018 mg/L in LB amphipods, respectively. On the other hand, acute and chronic WAF exposure (2.50 mg/L) did not cause mortality in DS amphipods.

Amphipods from DS presented a significant decrease in the GSH content and GST basal activity and a significant increase in CAT and CYP450 activities, compared to LB amphipods. Populations from DS and LB showed different behavior to WAF exposure. LB population showed a significant increase in both GSH content and CAT and CYP450 activities at WAF exposures, compared to control group. However, a significantly

decreased in GST activity was observed at 24 and 48 h of WAF exposure. On the other hand, DS population showed a significant increase in GSH content at 6 h of WAF exposure and presented a significant decreased on CAT activity at 24 h. Finally, GST and CYP450 activities were not significantly different from the control. Frequency distribution of CYP450 activity showed that 100% of DS amphipods exhibited individual CYP450 activities above LB mean upper 95% CL. Different esterases (EST) isoforms were identified in amphipods from DS and LB populations. Moreover, molecular studies were carried out to amplify fragments of 710 bp of CYP450 gen, from both control and WAF exposed LB amphipods.

From the species sensitivity distribution curve (SSD) to WAF on aquatic organisms, the concentration of 0.46 mg/L would affect the 10th percentile of aquatic species, including LB amphipods.

Results from this study indicated that $t_{1/2}$ of WAF compounds varied between 65-200 h. The 96 h-LC50 value of *H. curvispina* from LB, comprised within the 10th percentile estimated from the SSD, indicates its high susceptibility to WAF compounds. Nevertheless, the occurrence of tolerance to WAF in DS amphipods would indicate their adaptation ability to contaminated environments through increased activity of the detoxification system. Biochemical parameters studied could be used as oil pollution biomarkers. Reference levels of WAF toxicity were determined using SSD.

ABREVIATURAS

AChE: acetilcolinesterasa	EROS: especies reactivas de oxígeno
ACP: análisis de componentes principales	EST: esterasa
AD: población arroyo Durán	Fe-SOD: superóxido dismutasa de hierro
ADN: ácido desoxirribonucleico	GR: glutatión reductasa
ADNc: ácido desoxirribonucleico copia	GSH: glutatión reducido
AhR: receptor de hidrocarburos de arilo	GSSG: glutatión oxidado
ANOVA: análisis de la varianza	GST: glutatión S-transferasa
ARN: ácido ribonucleico	GT: glucuronosil transferasa
ARNm: ácido ribonucleico mensajero	H₂O₂: peróxido de hidrógeno
B[a]P: benzo[a]pireno	HA: hidrocarburos alifáticos
BSA: albúmina sérica bovina	HO•: radical hidroxilo
BTEX: benceno, tolueno, etilbenceno y xileno	LB: población lago Los Barreales
Carb: carbamato	LD: límite de detección
CAT: catalasa	LOEC: concentración mínima de efecto observado
CCl₃•: triclorometilo	LOO•: radical peroxilo
CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno	LOOH: hidroperóxidos lipídicos
CG: cromatografía gaseosa	Mn-SOD: superóxido dismutasa de manganeso
CL₅₀: concentración letal 50	NADH: nicotinamida adenina dinucleótido
Cu/Zn-SOD: superóxido dismutasa de cobre y zinc	NaOH: hidróxido de sodio
CYP450: citocromo P450 monooxigenasa	Ni-SOD: superóxido dismutasa de níquel
DRE: elemento de respuesta a dioxinas	NO•: óxido nítrico
DTNB: ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico	NOEC: concentración de efecto no observado
ECOD: 7-etoxicoumarina-O-deetilasa	O₂••: radical anión superóxido
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	O₂: oxígeno molecular
EE: error estándar	OC: organoclorado
EH: époxido hidrolasa	

OF: organofosforado
ONOO•: peroxinitrito
PAHs: hidrocarburos poliaromáticos
pb: pares de bases
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
Pir: piretroide
ps: peso seco
RO•: radical alcoxilo
ROO•: radical peroxilo
ROOH: hidroperóxidos
SOD: superóxido dismutasa
SSD: curva de distribución de sensibilidad de especies
ST: sulfotransferasa
t^{1/2}: tiempo de vida media
TCA: tricloro acético
TEMED: tetrametiletiléndiamina
TPHs: hidrocarburos totales de petróleo
WAF: fracción acomodada en agua de petróleo
XRE: elemento de respuesta a xenobióticos
α-NA: α-naftil acetato
7-EC: 7-etoxicoumarina
7-OHC: 7-hidroxicoumarina

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la industria petrolera y la creciente demanda de sus productos ha aumentado la vulnerabilidad ambiental, en especial de ecosistemas acuáticos, a los efectos tóxicos de la contaminación (Edema, 2012). El petróleo puede definirse como una mezcla compleja de hidrocarburos alifáticos y aromáticos junto con cantidades variables de azufre, nitrógeno, oxígeno y trazas de metales como níquel, vanadio y cromo (Law, 1993).

La contaminación del agua por hidrocarburos se debe principalmente a daños accidentales en tuberías y cisternas, descargas de desechos municipales o industriales, pequeñas fugas diarias de actividades de navegación y pesca, así como grandes derrames (Pacheco & Santos, 2001). La magnitud del daño depende del sitio y volumen que se ha derramado, como también del tiempo de permanencia en el entorno afectado. Generalmente, la contaminación acuática suele ser crítica en ríos y lagos, dado que presentan menores volúmenes de agua que los ambientes marinos, flujos unidireccionales y densidades menores a los crudos más pesados que conducen a fenómenos de hundimiento. Además, el petróleo se conserva mucho más tiempo en los ecosistemas de baja energía que en las costas marinas barridas por las olas (Bhattacharyya et al., 2003). Por lo tanto, resulta imprescindible estudiar los impactos de la contaminación por petróleo en hábitats de agua dulce.

La caracterización físico-química ha sido adoptada en forma frecuente para monitorear los niveles de contaminación de xenobióticos en diversos ambientes. Representa la condición del agua y/o sedimentos en el momento del muestreo (Springer et al., 2010). En forma complementaria a estos análisis, se realizan ensayos de toxicidad para evaluar los efectos biológicos de los contaminantes (Long et al., 1995). Los bioensayos permiten determinar la potencia relativa de un agente químico o biológico sobre los organismos. Por lo tanto, ambos estudios se han utilizado amplia y complementariamente en la evaluación de la calidad ambiental de un ecosistema (Lee et al., 2005).

La contaminación causada por petróleo puede provocar serios problemas a la vida acuática. La mayoría de las investigaciones toxicológicas sobre la contaminación con petróleo han revelado que su toxicidad es causada principalmente por la fracción acomodada en agua (WAF), en lugar de las gotitas dispersas de la fracción (Zhou et al., 1994). Si bien la toxicidad es en general mayor en compuestos que tienen alto peso molecular, los agentes responsables de los efectos tóxicos en organismos acuáticos son

aquellos con bajo peso molecular debido a su mayor solubilidad en agua y, como resultado, mayor biodisponibilidad. La WAF es diferente del petróleo original y las concentraciones de sus componentes dependen principalmente de variables como el tipo de crudo, la relación petróleo-agua, el tiempo de mezcla y la temperatura de exposición (Maher, 1986; Faksness et al., 2008). En consecuencia, pueden existir diferencias en las toxicidades de WAF obtenidas de diferentes tipos de petróleo (Wells et al., 1993).

Al igual que otros xenobióticos, los efectos tóxicos de la WAF en los organismos se manifiestan primero a nivel bioquímico-molecular y luego se transmiten a los siguientes niveles de organización biológica (Nikinmaa, 2014).

1.1. Composición y características del petróleo

El petróleo se caracteriza por ser un líquido viscoso, inflamable, de olor característico y color amarillento oscuro o negro (Law, 1993). Sus principales componentes se dividen en cuatro fracciones (Tabla 1.1): saturada, aromática, de resinas y de asfaltenos (menos abundantes y consisten en compuestos más polares) (Speight, 1991). La composición de la mezcla depende de la fuente, la edad y las condiciones de la formación geológica (Fingas, 2015).

Tabla 1.1: Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo. Adaptado de Speight (1991).

Fracción	Composición
<i>Saturados</i>	n-alcanos, alcanos de cadena ramificados e isoprenoides, cicloparafinas o cicloalcanos, hopanos.
<i>Aromáticos</i>	Hidrocarburos monoaromáticos, diaromáticos y poliaromáticos (PAHs).
<i>Resinas</i>	Agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas.
<i>Asfaltenos</i>	Agregados de PAHs, ácidos nafténicos, sulfuros, ácidos grasos, metaloporfirinas, fenoles polihidratados.

1.2. Clasificación del petróleo

De acuerdo a Mustafa et al. (2014), existen cuatro tipos de clasificaciones del petróleo:

1. **Factor K_{UOP} :** es un método desarrollado por la sociedad Universal Oil Product que permite identificar o caracterizar el tipo de crudo en cuanto a su composición química (base parafínica, mixta, nafténica o aromática). Se basa en un factor de caracterización (K) que se define como:

$$K = TB/S$$

donde TB es el punto de ebullición molar promedio en grados Ranking ($^{\circ}F$ absoluto) y S es el peso específico a $60^{\circ}F$.

Un valor K de 12,1 estará representado por un crudo de *base parafínico*, mientras que un valor menor de 11,5 determinará que se trata de un *nafténico*. Los valores intermedios están representados por crudos mixtos.

2. **Saturación de hidrocarburos:** clasifica al crudo de acuerdo a la saturación de hidrocarburos presentes en él como (a) *parafinado*, si posee más del 75% de saturación de hidrocarburos; (b) *aromático*, si está sobre el 45%; (c) *asfaltémico*, si por el contrario tiene saturación en químicos como el azufre, metales y otros residuos, y; (d) *base mixta*, si tiene los tres componentes en un nivel similar, el cual es el más común.
3. **Contenido de azufre:** clasifica al crudo de acuerdo al porcentaje promedio de azufre que contiene. Se denomina *dulce* cuando el porcentaje de azufre es menor a 0,5%; *agrio*, entre 0,5% y 1%; y *alto*, mayor al 1%.
4. **Grados API (American Petroleum Institute):** clasifica al crudo teniendo en cuenta su gravedad específica, donde:

$$^{\circ}API = 141,5/gravedad\ específica - 131,5$$

Esta clasificación resulta útil para determinar la flotabilidad o el hundimiento de un crudo vertido en agua. Son considerados crudos livianos aquellos que presentan $^{\circ}\text{API} > 31,1$ y crudos medios, los comprendidos entre 22,3 y 31,1 $^{\circ}\text{API}$.

1.3. Dinámica de los hidrocarburos de petróleo en el medio ambiente

La contaminación por hidrocarburos es una de las principales causas del deterioro de la calidad de agua a nivel mundial. Este tipo de contaminación no sólo produce cambios en las características físico-químicas del agua, sino que también genera alteraciones sobre el ecosistema debido al impacto negativo de estos tóxicos sobre sus diferentes componentes. La contaminación puede presentarse en forma puntual y/o sistemática. La primera sucede de forma imprevista en los cursos de agua; mientras que la segunda, es frecuente debido a la actividad antrópica que en ellos se realiza. Además, las fuentes de la contaminación pueden ser simples o múltiples, y verter al medio uno o varios componentes del petróleo (Prieto Díaz & Martínez de Villa Pérez, 1999).

Los hidrocarburos de petróleo pueden ingresar a los sistemas acuáticos como productos derivados de la industria del petróleo tales como combustibles, aceites lubricantes y productos de combustión incompleta en la emisión de gases de escape (Müller, 1987).

El destino y la persistencia de petróleo en los cursos de agua están controlados por procesos que varían considerablemente en el espacio y el tiempo. La figura 1.1 muestra los procesos físicos, químicos y biológicos que experimenta el petróleo cuando se lo introduce en el ambiente acuático. Los procesos más importantes incluyen la evaporación, disolución, emulsificación, dispersión dentro de la columna de agua, oxidación fotoquímica, degradación microbiana, adsorción al material particulado en suspensión, y la acumulación en el sedimento. A medida que el crudo envejece, también puede experimentar diversos procesos de transporte, incluyendo advección y dispersión, dispersión y arrastre, hundimiento y sedimentación, compartimentación y biodisponibilidad, entre otros (NRC, 2003).

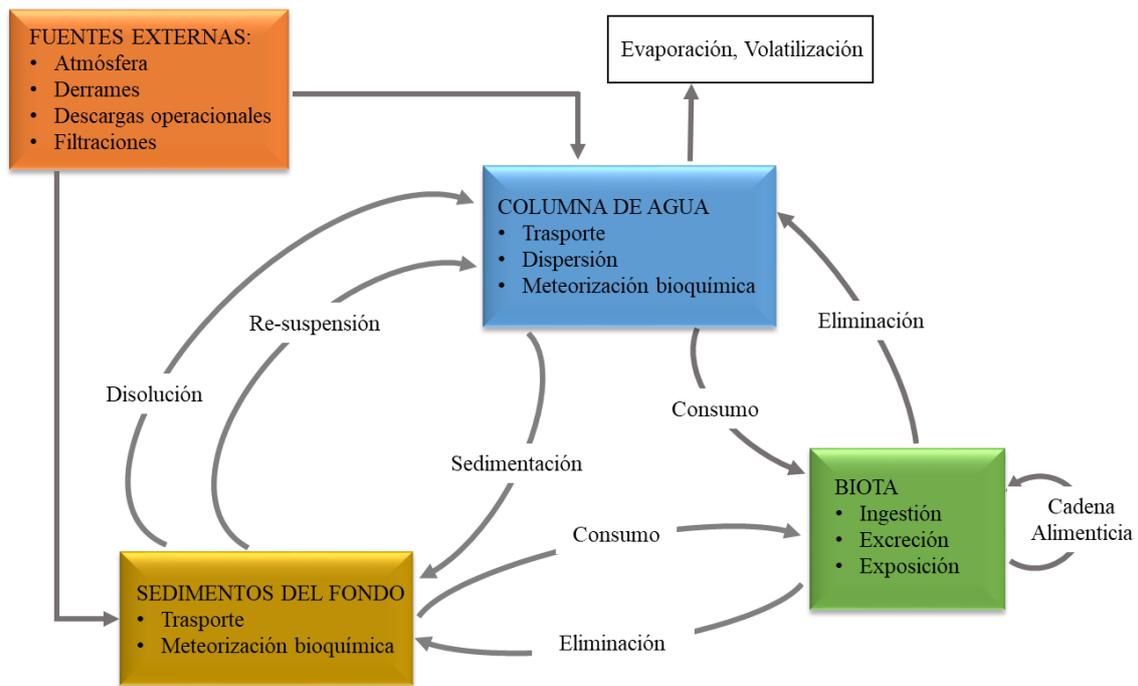


Figura 1.1: Representación gráfica de la dinámica del petróleo en el medio acuático.

Adaptado de NRC (2013).

Cuando el petróleo se extiende en la superficie del agua, las moléculas pequeñas (o compuestos de bajo peso molecular) comienzan a evaporarse. Las pérdidas por evaporación causan cambios considerables en la composición y propiedades de un vertido. Los crudos livianos pueden perder hasta un 75% de su volumen inicial en pocos días y los medianos hasta un 40%. En cambio, la evaporación de los crudos más pesados es mucho menor (<10%) (NRC, 2003). Dentro de los hidrocarburos aromáticos, benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX) y algunos PAHs de bajo peso molecular, se evaporan casi totalmente en poco tiempo. En general, los compuestos se vuelven mucho más estables a medida que aumenta el número de anillos en su estructura (Fingas, 2015). Así como las moléculas pequeñas se evaporan y trasladan a la atmósfera, otras pueden sufrir procesos de oxidación. Algunos hidrocarburos aromáticos, particularmente los PAHs y los heterociclos aromáticos (-N, -S y -O), reaccionan con el oxígeno produciendo compuestos oxigenados, los cuales son más solubles en agua y generalmente más resistentes a la biodegradación que los compuestos originales. La oxidación es muy

importante desde el punto de vista de pérdida de masa de un vertido. Las dos vías más importantes de oxidación son la fotooxidación y la oxidación microbiana (NRC, 2003). Cuando en el ambiente acuático se producen movimientos por el viento y/u oleaje, se pueden generar emulsiones. Las emulsiones estables se forman cuando pequeñas gotas de agua quedan atrapadas en el interior de la masa de un vertido de petróleo. Las emulsiones, al incorporar hasta un 80% de agua, aumentan considerablemente el volumen del crudo derramado (de dos a cinco veces) y su viscosidad. Este cambio en sus propiedades puede enlentecer los procesos de evaporación y disolución. Por lo general, las emulsiones dejan de flotar en la superficie del agua y se sumergen en la columna de agua. El tipo de emulsión formada depende de las condiciones ambientales del medio como la temperatura, viento, oleaje y de la masa y composición química del petróleo (Fingas & Fieldhouse, 2015).

La fracción más hidrosoluble del petróleo (<5%) se disuelve en el agua. Los compuestos que integran esta fracción son algunos de los hidrocarburos aromáticos, especialmente los BTEX (Irwin et al., 1998). La importancia de la disolución reside en que a través de este proceso se transfiere la toxicidad del crudo al agua, dado que los compuestos más hidrosolubles también resultan ser los más tóxicos para la biota (NRC, 2003). Generalmente, los compuestos de alto peso molecular tienen una solubilidad extremadamente baja en agua por lo que se depositan y acumulan en los sedimentos (Brandt et al., 2002; Sammarco et al., 2013). Al mismo tiempo, los hidrocarburos depositados en los sedimentos pueden transferirse al agua y al aire por circulación geoquímica, aumentando la contaminación secundaria (Ho et al., 1999; McLachlan et al., 2002).

Por otro lado, debido a que la mayoría de los compuestos del petróleo tienen carácter lipofílico, pueden acumularse en los tejidos grasos de la fauna acuática (bioacumulación), como es el caso de los macroinvertebrados bentónicos y de los peces (Meador et al., 1995; Zambrano et al., 2012). La bioacumulación puede dar lugar a la biomagnificación a través de los niveles tróficos y, dado que muchas especies de invertebrados están relacionadas indirectamente con la dieta humana, constituyen una fuente de exposición para el hombre (Dixon et al., 2002).

Hay pocos datos disponibles sobre la persistencia de hidrocarburos en el medio ambiente. Entre los hidrocarburos del petróleo, los PAHs tienen tiempos de vida media ($t_{1/2}$) que van desde semanas para las fracciones de bajo peso molecular, hasta años, para los compuestos de alto peso molecular (Brandt et al., 2002).

1.4. Sitio y mecanismo de acción

Generalmente, la narcosis constituye el principal modo de acción que conduce a la toxicidad aguda en invertebrados acuáticos por exposición a petróleo (Dupuis & Ucan-Marin, 2015). La narcosis ocurre porque las sustancias químicas hidrofóbicas aumentan la fluidez de las membranas celulares, lo cual resulta en la interrupción general de las funciones del sistema nervioso central (Barron et al., 2004). La narcosis es el resultado de una interrupción general y reversible del funcionamiento de la membrana celular. Se produce una depresión general de la actividad biológica debido a la interacción tóxica con las membranas.

Otras de las respuestas tóxicas que se han documentado en invertebrados se han asociado con la unión de los hidrocarburos a los receptores de hidrocarburos de arilo (AhR) (Dupuis & Ucan-Mari, 2015). Diversos compuestos aromáticos, como los PAHs, presentan como mecanismo de señalización principal su unión al AhR (Landers & Bunce, 1991). Este receptor se encuentra inactivo en el citosol unido a la proteína HSP90. En presencia de ligandos lipofílicos planares, el AhR se disocia de HSP90, y en presencia del factor translocador nuclear del receptor de arilos (ARNT) se transloca al núcleo en forma de un nuevo heterodímero activo. Este heterodímero es un factor de transcripción que se une a un elemento de respuesta a xenobióticos en el ADN conocido como XRE, el cual regula una batería muy importante de genes (Dalton et al., 2002). Entre las proteínas cuya expresión es regulada por xenobióticos a través de AhR, la principal la constituye la familia de citocromo P450 (CYP450).

El tipo particular de interacción entre la molécula biológica con la cual interactúa el xenobiótico dentro del organismo determinará si el efecto es amplio o más específico dentro del organismo (Landis & Yu, 2004).

1.5. Efectos de los hidrocarburos

Los hidrocarburos pueden causar efectos directos e indirectos en los organismos acuáticos (Figura 1.2). Los efectos directos se producen por la acción fisiológica de un tóxico dentro de un organismo. En general, dependen de la concentración, características fisico-químicas, frecuencia y duración de la exposición del tóxico.

Asimismo, los efectos directos pueden clasificarse en letales y subletales. Los primeros consisten en la muerte por acción directa de exposiciones agudas a los tóxicos (Schäfer et al., 2011).

Los efectos subletales disminuyen la capacidad física de un individuo y ocurren por exposiciones de mayor duración y a una concentración o dosis inferior a la que produce la muerte directa. Producen cambios en el organismo que afectan negativamente su fisiología o comportamiento. Los cambios fisiológicos incluyen estrés oxidativo, disminución de la fecundidad o fertilidad, retardo en el desarrollo, reducción de la longevidad y cambios en el sistema inmunológico, entre otros. Los efectos en el comportamiento hacen referencia a los cambios en la conducta de la alimentación, movilidad, navegación, orientación y aprendizaje (Desneux et al., 2007). Además, los efectos subletales causan cambios en las poblaciones sin causar directamente la mortalidad de los individuos.

Los organismos dependen de una serie de interacciones con otras especies para su supervivencia. Los efectos indirectos son aquellos que son mediados a través de estas interacciones inter-específicas: depredación, competencia, mutualismo, comensalismo y parasitismo. Los contaminantes como los hidrocarburos del petróleo, pueden causar efectos tóxicos indirectos en la cadena trófica y cambios en la abundancia y estructura en la comunidad de organismos acuáticos (Fleeger et al., 2003). Como respuesta al estrés ambiental, las especies susceptibles son reemplazadas por las más tolerantes, que pueden adaptarse a las nuevas condiciones mediante la aclimatación fisiológica durante las exposiciones subletales en algún momento de sus vidas (Klerks & Weis, 1987).

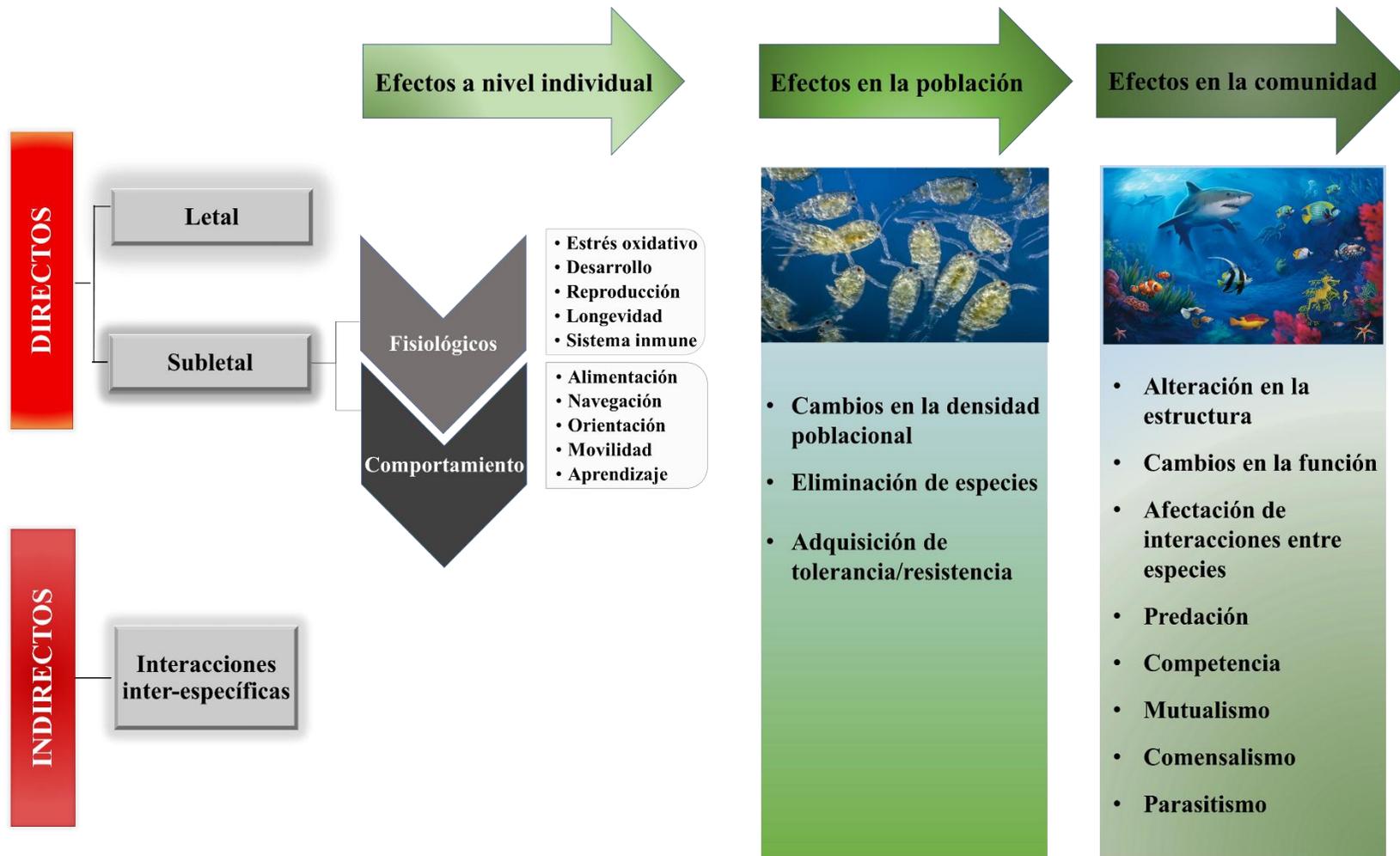


Figura 1.2: Clasificación de los efectos producidos por los xenobióticos en un ecosistema. Adaptado de Schäfer et al. (2011).

1.5.1. Efectos a nivel individual

A nivel individual, uno de los efectos directos que causan los hidrocarburos en los organismos es la muerte. La toxicidad de un xenobiótico se estima habitualmente a través de un parámetro denominado concentración letal 50 (CL50). La CL50 puede definirse como la concentración (dosis) que mata al 50% de la población bajo determinadas condiciones de ensayo. La exposición puede ser aguda, cuando es de corta duración (hasta 96 h) y crónica, cuando considera un periodo de tiempo relativamente largo. Varios estudios han presentado valores de toxicidad aguda y crónica para hidrocarburos en diferentes especies de crustáceos (Lavarías et al., 2004; Martínez-Jerónimo et al., 2005; Ekanem et al., 2011).

Dentro de los efectos directos, también se encuentran los subletales. Los estudios sobre los efectos subletales de los hidrocarburos en los organismos acuáticos se refieren a alteraciones que afectan su fisiología y/o comportamiento.

- *Estrés oxidativo*

Las especies reactivas de oxígeno (EROS) son producidas continuamente por organismos vivos como resultado del metabolismo celular normal. Constituyen moléculas esenciales en el control fisiológico de diferentes funciones celulares. Cuando se encuentran en concentraciones bajas, participan en procesos celulares fisiológicos. Sin embargo, cuando las concentraciones de EROS aumentan, pueden producir modificaciones adversas a las estructuras celulares, lípidos, proteínas y ADN. El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros, que conlleve a un daño celular a nivel de las biomoléculas, se denomina "estrés oxidativo" (Sies, 1993).

Las EROS se pueden clasificar en dos grupos, radicales libres y no radicales. Los radicales libres son átomos o moléculas que contienen uno o más electrones desapareados, característica que los hace muy reactivos. Las formas no radicales se producen cuando dos radicales libres comparten sus electrones desapareados. Las principales EROS son el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Otros radicales libres derivados del oxígeno son los radicales alcoxilo (RO^{\bullet}) y peroxilo (ROO^{\bullet}), óxido nítrico (NO^{\bullet}), peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) y triclorometilo (CCl_3^{\bullet}). Algunas de estas sustancias químicas, como el $O_2^{\bullet-}$ o el OH^{\bullet} , son extremadamente inestables,

mientras que otros, como el H₂O₂, tienen una vida media relativamente más larga y difunden fácilmente (Scandalios, 2002; Halliwell & Gutteridge, 2006).

El aumento en la producción de EROS se origina a partir de fuentes endógenas y exógenas. Los factores exógenos incluyen la radiación solar, plaguicidas, hidrocarburos y metales pesados (Van der Oost et al., 2003). Además, se ha demostrado que las variaciones estacionales en el ecosistema, como la temperatura del agua, el pH, el oxígeno disuelto y la disponibilidad de alimentos, modifican el metabolismo de los invertebrados acuáticos y, por lo tanto, tienen influencia sobre el nivel de estrés oxidativo (Verlecar et al., 2008). Además, los cambios en los requerimientos metabólicos de los organismos durante su ciclo de vida causan una producción diferencial de EROS que influyen en la susceptibilidad al estrés oxidativo.

En crustáceos, la exposición a xenobióticos como los hidrocarburos puede producir EROS que conllevan a estrés oxidativo (Lavarías et al., 2011; Wu et al., 2011). Sin embargo, se ha estudiado que estos organismos utilizan EROS como moléculas de señalización que resultan fundamentales para el crecimiento celular, la división y su desarrollo (Fanjul-Moles & Gonsebatt, 2012).

Para minimizar los efectos dañinos producidos por las EROS, los organismos han desarrollado un complejo sistema de defensa antioxidante.

- *Desarrollo*

El crecimiento normal y las reservas de energía adecuadas son fundamentales para la supervivencia de los organismos juveniles. Además, tiene una gran influencia en el potencial reproductivo en su fase adulta. En los crustáceos, el crecimiento implica la eliminación del antiguo exoesqueleto y la formación de un nuevo tegumento de mayor tamaño, proceso conocido como ciclo de muda. La muda constituye un proceso fisiológico muy importante para los crustáceos porque no solo permite su desarrollo, sino que también está asociado a la metamorfosis durante las primeras etapas del ciclo de vida y la reproducción durante su estadio adulto (Zou, 2005). Por lo tanto, la interrupción de la muda puede dar como resultado alteraciones en el crecimiento. La exposición a contaminantes como los hidrocarburos produce una disminución del crecimiento durante la muda (Weis et al., 1992). En larvas de crustáceos *Eurypanopeus depressus* se observó una mayor duración de los periodos entre mudas y un estadio adicional de megalopa con anomalías morfológicas (Cucci & Epitafio, 1979). La exposición a pireno produjo un

retraso significativo en la muda y reproducción en machos del camarón *Palaemonetes pugio* (Oberdörster et al., 2000). También han sido reportados retrasos en el desarrollo larval e inhibición en el crecimiento y muda en larvas de varias especies de crustáceos por exposición a hidrocarburos (Cantelmo et al., 1981; Wang & Stickle, 1987; Weis et al., 1992; Amin & Comoglio, 2002). Estas respuestas se han asociado a disrupciones energéticas y al efecto de estos compuestos sobre las vías metabólicas normales de los ácidos grasos (Capuzzo & Lancaster, 1981).

Por otro lado, se observó un retraso en el desarrollo embrionario y deformidades en el pez arcoíris *Melanotaenia fluviatilis* por la exposición a WAF (Pollino et al., 2002).

- Reproducción

Los efectos disruptivos en la reproducción se utilizan frecuentemente en estudios ambientales y toxicológicos debido a su gran influencia a nivel de población a largo plazo y la relevancia ecológica (Lewis & Watson, 2012). Varios estudios han documentado los efectos de los hidrocarburos sobre la reproducción en los organismos acuáticos. La exposición a β -clorociclohexano indujo una excesiva vitelogénesis en *Poecilia reticulata* (Wester, 1991). En adultos del pez arcoíris (*M. fluviatilis*) se observó una disminución en los niveles plasmáticos de cortisol y estradiol (Tintos et al., 2007) y un aumento de testosterona (Pollino et al., 2002) cuando fueron expuestos a naftaleno. Sarojini et al. (1995) demostraron atresia ovárica con una notable degeneración de los oocitos previtelogénicos y vitelogénicos en el decápodo *Procambarus clarkii* por exposición a naftaleno. La exposición prolongada a petróleo en individuos del cangrejo azul (*Callinectes sapidus*) afectó el desarrollo de los embriones (Kelly & Taylor, 2018).

- Sistema inmune

Los crustáceos han desarrollado sistemas de defensa que los protegen contra agentes patógenos como virus, bacterias y hongos. Los mecanismos de defensa inmunológicos incluyen procesos como la aglutinación, encapsulación, fagocitosis, proteínas coagulables y actividad bactericida (Vazquez et al., 2009).

Los contaminantes ambientales afectan de forma adversa al sistema inmune de los organismos acuáticos (Galloway et al., 2001). El estudio de los efectos de PAHs a nivel celular en hemocitos del decápodo *Carcinus maenas*, reveló una reducción de la

viabilidad celular y la actividad de fagocitosis (Dissanayake et al., 2010). Asimismo, se observaron niveles reducidos de fagocitosis en los hemocitos de ostras contaminadas con PAHs (Sami et al., 1993). Carlson et al. (2002) han demostrado que la exposición a benzo[a]pireno (B[a]P) produce una marcada depresión en la proliferación de linfocitos en el pez *Oryzias latipes*.

- *Comportamiento en la alimentación*

Los hidrocarburos pueden provocar cambios en el comportamiento de alimentación de los organismos acuáticos. Los resultados de un estudio realizado en crustáceos de la especie *Homarus americanus* mostraron cambios en la forma en que monitoreaban su entorno y un aumento en el tiempo que requerían para encontrar comida, incluso cuando tenían hambre (Atema & Stein, 1974). Otro estudio reveló alteraciones en el comportamiento de alimentación de cangrejos (mayor tiempo de manejo de presas) expuestos a PAHs (Dissanayake et al., 2010). En concordancia con estos resultados, Scarlett et al. (2009) observaron tiempos más largos de manejo de presas en cangrejos alimentados con mejillones expuestos a hidrocarburos y mayor vulnerabilidad a la depredación. Estudios conductuales realizados con el crustáceo *Uca pugnax* proveniente de un sitio contaminado con petróleo mostraron respuestas de escape más lentas y disminuciones en las tasas de alimentación (Culbertson et al., 2007).

La alimentación reducida es una respuesta común a los contaminantes. En peces de la especie *Fundulus heteroclitus* que residían en aguas contaminadas disminuyó la capacidad de captura de la presa en comparación con aquellos que habitaban aguas más limpias (Weis et al., 2001).

- *Movilidad*

Una de las primeras manifestaciones de las larvas expuestas a WAF suele ser la falla en la actividad natatoria (Amin & Comoglio, 2002). En larvas de las especies *Lithodes santolla* y *Paralomis granulosa* se detectaron problemas de movilidad (Amin & Comoglio, 2002). A niveles altos de exposición a petróleo se observaron anomalías en la natación, tales como baja velocidad, natación inversa y movilidad reducida en larvas y adultos de *Aurelia aurita* y *Mnemiopsis leidyi* (Almeda et al., 2013). También se observó una pérdida en las habilidades natatorias de larvas *Balanus amphitrite* y *B.*

variegatus expuestas a queroseno (Morton & Wu, 1977). Asimismo, la exposición a PAHs en adultos del pez cebra *Danio rerio* redujo la tasa metabólica activa y la velocidad de natación (Lucas et al., 2016).

- *Epigenética*

La epigenética refiere a cambios heredables en la estructura y organización del ADN, los cuales no involucran cambios en la secuencia y modulan la expresión génica. Los cambios en la expresión génica implican cambios heredables en el fenotipo. Los mecanismos de regulación epigenética incluyen metilación del ADN y modificaciones de histonas, con un subsecuente efecto sobre la salud del individuo, de su descendencia y en la evolución de la especie (García et al., 2012).

Las implicaciones ecotoxicológicas más relevantes de la epigenética incluyen (a) cambios epigenéticos, inducidos por exposición a xenobióticos u otros estresores, heredados transgeneracionalmente con fenotipos asociados y (b) tolerancia inducida por exposición prolongada a xenobióticos a través de un cambio en la variación epigenética dentro de una población (un cambio en el fenotipo de la población) (Vandeghechuchte & Janssen, 2014).

La epigenética puede afectar a todos los niveles de organización biológica, desde las interacciones entre los xenobióticos y las especies, hasta las interacciones entre y dentro de las especies y entre las especies y los ecosistemas (Vandeghechuchte & Janssen, 2014). Los efectos epigenéticos pueden originarse por factores de estrés ambiental (deficiencia de agua, alteraciones de la luz y temperatura, concentraciones de materia orgánica) así como también por la exposición a xenobióticos (plaguicidas, hidrocarburos, dioxinas, metales). Los hidrocarburos como los PAHs pueden inducir cambios epigenéticos en organismos acuáticos. Se detectaron alteraciones en la metilación del ADN en tumores de hígado del pez cebra (*D. rerio*) inducidos por 7, 12-dimetilbenz[a]antraceno (Mirbahai et al., 2011). Fang et al. (2013) reportaron que la exposición a B[a]P disminuyó la metilación del ADN global durante el desarrollo del pez cebra.

1.5.2. Efectos en las poblaciones

Cuando los hidrocarburos ingresan al ambiente, la población de una especie puede ser afectada de diferentes maneras, dependiendo de las condiciones ambientales de su

entorno. Los cambios observados se dan principalmente en la abundancia y en la diversidad genética poblacional. Además, puede producirse la eliminación de las especies más sensibles, mientras que otras pueden persistir y recuperarse a través de mecanismos de tolerancia. La tolerancia puede definirse como la capacidad de los organismos para afrontar al estrés, causado por la presencia de contaminantes en el medio ambiente (Amiard-Triquet et al., 2011).

Los hidrocarburos pueden influir en las tasas de natalidad y mortalidad, y por lo tanto sobre la dinámica de las poblaciones. Maccarone & Brzorad (1995) observaron una disminución significativa en las poblaciones de camarones y peces de mayor tamaño después de sucesivos derrames. Un estudio realizado a escala de mesocosmos, reveló una reducción en la población de copépodos por la exposición a B[a]P, a pesar de su bajo tiempo de residencia en la columna de agua (Ikenaka et al., 2013).

Las diferentes respuestas a los hidrocarburos también pueden ser una consecuencia de la variabilidad en la tolerancia de las especies. Si bien, la continua exposición a un tóxico puede provocar el debilitamiento de individuos expuestos, también puede resultar en la adquisición de una mayor tolerancia. La adquisición de una mayor tolerancia a un contaminante en una especie puede deberse a una aclimatación fisiológica, resistencia o efectos maternos.

La aclimatación fisiológica hace referencia a la tolerancia adquirida por los organismos como resultado de procesos fisiológicos no heredables (Amiard-Triquet et al., 2011). Se han detectado cambios no genéticos (aclimatación fisiológica), como la inducción en la actividad enzimática en organismos acuáticos (Rewitz et al., 2003; Martínez-Gómez et al., 2009; Jung & Di Giulio, 2010).

Cuando los mecanismos implicados en la tolerancia son de origen genético (adaptación genética) y se pueden transferir a la progenie, se clasifican como resistencia. La resistencia ha sido definida como la capacidad de algunos organismos de una especie de tolerar una concentración de tóxico que podría resultar letal para la mayoría de los individuos de la población. El desarrollo de resistencia a PAHs se ha demostrado en poblaciones de peces *F. heteroclitus* (Lindberg et al., 2017).

Wolf & Wade (2009) definieron los efectos maternos como la influencia causal del genotipo o fenotipo materno en el fenotipo de la descendencia. Hall & Oris (1991) observaron que el antraceno reduce el potencial reproductivo y se transfiere por vía materna durante la exposición a largo plazo en peces.

1.5.3. Efectos en las comunidades

El nivel de daño a una comunidad acuática por un derrame de petróleo depende de varios factores como el volumen y las características físico-químicas del petróleo, las características hidrológicas del curso de agua, el grado de contaminación, la época del año y la tolerancia inherente de los organismos, entre otros.

Las comunidades se encuentran compuestas por especies que cumplen diferentes roles dentro de la misma. Dado que cada especie presenta diferente sensibilidad a los contaminantes, a menudo estos xenobióticos modifican la estructura y función de la comunidad a través de sus efectos selectivos. Este cambio en la estructura puede deberse a la afectación de variables como la tasa de natalidad, la tasa de depredación, la mortalidad y la densidad de población (Hanazato, 2001).

Muchos estudios han reportado la respuesta de la comunidad a la contaminación por petróleo o sus productos derivados. Crunkilton & Duchrow (1990) estudiaron los impactos a largo plazo de un derrame masivo de petróleo en la comunidad bentónica de macroinvertebrados de un curso de agua y observaron una reducción drástica de los organismos (menor al 0,1% de lo esperado). Los índices de diversidad de especies y el número de taxones de efemerópteros y plecópteros fueron inferiores a los valores mínimos establecidos para cursos de aguas no contaminadas del lugar. En un estudio realizado a escala pequeña de mesocosmos, la exposición a B[a]P afectó la abundancia y estructura en la comunidad del zooplancton. Consecuentemente mostró una remoción de la población de cladóceros y una inducción en la dominancia de rotíferos (Ikenaka et al., 2013). Carman et al. (2000) mostraron que los efectos tóxicos de petróleo en los crustáceos bentónicos conducen a cambios drásticos en la composición de las comunidades de microalgas bentónicas. La reducción en la abundancia y diversidad de crustáceos bentónicos condujo a un alto crecimiento de especies de microalgas bentónicas. A su vez, estos cambios permitieron la formación de densas biopelículas de microalgas, que alteraron el flujo de nutrientes y oxígeno entre los sedimentos y el agua que los recubría. Otro estudio evaluó los impactos de un derrame de diésel en la comunidad de macroinvertebrados en dos cursos de agua dulce. Los efectos en la comunidad bentónica fueron muy notorios, con sólo un 9% de supervivencia de individuos (excluyendo a los oligoquetos) y una reducción del 44% de las familias de macroinvertebrados (Smith et al., 2010). Dentro de la comunidad de macroinvertebrados, los anfípodos fueron el grupo más sensible. Ferrando et al. (2015) simularon un derrame

de petróleo para evaluar los efectos en la estructura de la comunidad macrobentónica patagónica. Sus resultados mostraron una marcada disminución en la densidad y riqueza específica de macroinvertebrados.

Los hidrocarburos, además de afectar la composición y/o estructura de la comunidad, pueden influir en las interacciones de la red alimentaria. Esta situación fue demostrada por Carman et al. (1997) quienes informaron un gran aumento en la biomasa de microalgas expuestas a diésel, debido a la reducción en el pastoreo por la meiofauna (copépodos y nematodos) y una competencia entre copépodos y nematodos por la disminución de su alimento (algas).

1.6. Mecanismos bioquímicos de defensa

Los organismos bentónicos pueden acumular hidrocarburos directamente de la columna de agua o del agua intersticial del sedimento como consecuencia de la distribución química entre ellos. La incorporación de hidrocarburos de petróleo puede ser directamente de la solución de agua a través de las branquias y el tegumento, desde alimentos contaminados adsorbidos en partículas, o directamente desde los sedimentos del fondo contaminados (Bhattacharyya et al., 2003).

Una vez que el contaminante ingresa al organismo, se distribuye por el sistema circulatorio a los diferentes tejidos con una determinada velocidad, que dependerá de factores como el pH del medio, su carácter ácido o básico y su liposolubilidad, su capacidad de interactuar con macromoléculas, entre otros. Simultáneamente, el xenobiótico sufrirá un proceso de biotransformación, es decir, una serie de transformaciones químicas catalizadas por enzimas que introducen grupos polares en partes de la molécula de menor polaridad. En función de las propiedades del xenobiótico, este proceso puede conducir a una mayor eliminación, detoxificación, secuestro, redistribución o activación (Nikinmaa, 2014).

En general, la respuesta al estrés y la detoxificación de xenobióticos incluye tres vías principales que se encuentran interrelacionadas: óxido-reducción, conjugación e hidrólisis (Figura 1.3) (Xu et al., 2013).

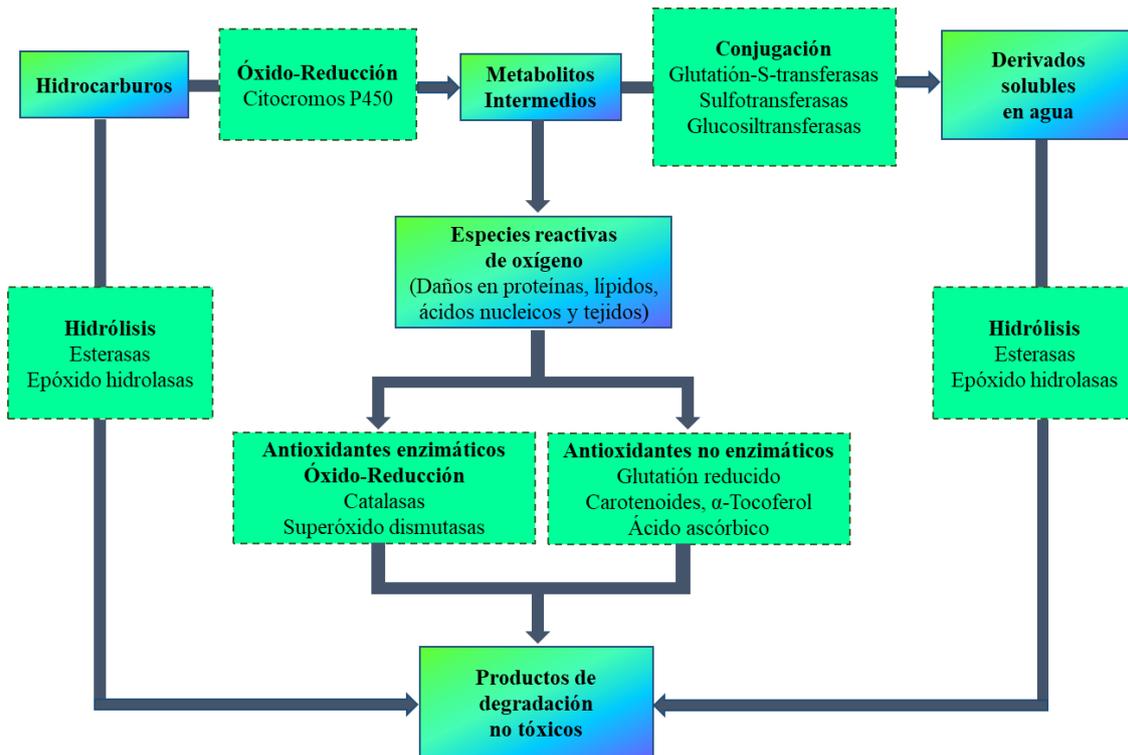


Figura 1.3: Vías de detoxificación. Los cuadros sólidos indican los compuestos químicos ambientales o productos de los procesos metabólicos. Los cuadros de guiones indican las vías de detoxificación principales. Adaptado de Xu et al. (2013).

Las reacciones de óxido-reducción modifican la estructura química del xenobiótico con grupos reactivos (oxhidrilo, carboxilo, sulfhidrilo, amino). Las enzimas involucradas en estas reacciones son la familia de CYP450, las hidrolasas y reductasas. Las CYP450 son las principales enzimas que participan en la detoxificación de los hidrocarburos (Chaty et al., 2004; Rhee et al., 2013). Sin embargo, estos procesos oxidativos pueden producir EROS como metabolitos intermedios. Estos metabolitos pueden ser detoxificados mediante un complejo sistema de defensa antioxidante, el cual se divide en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. El primer grupo comprende a las enzimas de óxido-reducción como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutación S- transferasa (GST), entre otras. El segundo, incluye compuestos como el glutación reducido (GSH), carotenoides, α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), entre otros (Josephy et al., 2005).

Los productos de las reacciones de óxido-reducción pueden metabolizarse aún más a través de la conjugación. La conjugación implica la unión de los grupos funcionales reactivos con una molécula endógena de bajo peso molecular (GSH, sulfato, ácido

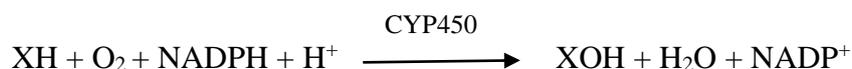
glucurónico o aminoácidos). Dentro del grupo de enzimas de conjugación se encuentran las GST, las sulfotransferasas (ST) y las glucuronosil transferasas (GT), entre otras. Generalmente, los productos de estas reacciones de conjugación son más polares que sus respectivos sustratos y, por lo tanto, más fácilmente eliminables a través de la excreción (Parkinson & Ogilvie, 2008). Sin embargo, en algunos casos pueden producirse metabolitos más tóxicos que el original, proceso denominado bioactivación (Newman, 2015).

El mecanismo de detoxificación también puede llevarse a cabo a través del proceso de hidrólisis, mediante el cual una molécula de agua le transfiere un átomo de hidrógeno y un oxidrilo al xenobiótico. Las principales enzimas de hidrólisis son las esterasas (EST) y epóxido hidrolasas (EH).

1.6.1. Enzimas de oxidación y reducción

- Citocromo P450 monooxigenasas (CYP450)

Los citocromos P450 constituyen una gran familia de enzimas que tienen una función clave en la oxidación de xenobióticos y moléculas endógenas. Estas enzimas insertan un átomo de oxígeno al xenobiótico (X) y reduce el segundo oxígeno a una molécula de agua, utilizando dos electrones que son proporcionados por la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH) a través de una proteína reductasa:



Se encuentran presentes en todos los organismos eucariotas y algunos procariotas (Meunier et al., 2004). Los organismos eucariotas poseen múltiples CYP450 que se encuentran tanto en el retículo endoplásmico como en las mitocondrias (Omura, 2006).

En los crustáceos, el hepatopáncreas constituye el sitio donde ocurre la biotransformación dependiente de CYP450 en la mayoría de los xenobióticos. Sin embargo, se ha demostrado que otros tejidos, como las branquias, el estómago y el intestino, tienen actividad similar a CYP450 y los roles de estos tejidos puede ser importante para sustratos fisiológicos, así como para ciertos xenobióticos, dependiendo de la ruta de exposición (James & Boyle, 1998).

La expresión de los genes CYP puede ser inducida por xenobióticos que se unen a las proteínas receptoras, lo que a su vez produce un aumento en la síntesis de proteínas y la actividad enzimática relacionada (Honkakoski & Negishi, 2000). La inducción de la actividad enzimática CYP450 por la exposición a hidrocarburos ha sido reportada en varias especies de crustáceos (Fossi et al., 1996; Oberdörster et al., 2000; Rewitz et al., 2003; Webb, 2011).

- *Catalasas (CAT)*

La CAT es una enzima citoplasmática que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, de acuerdo con la siguiente reacción (Matés, 2000):

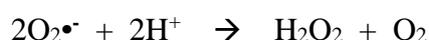


En invertebrados, la actividad CAT es inducida por el estrés oxidativo causado por los hidrocarburos (Cheung et al., 2001; Zhang et al., 2004b; Lavarías et al., 2011; Sandrini-Neto et al., 2016).

Por otra parte, estudios más recientes demuestran que la CAT está involucrada en la defensa inmune innata de los crustáceos contra infecciones microbianas. En la especie *Fenneropenaeus chinensis*, la expresión de CAT aumentó después de la inyección del virus del síndrome de la mancha blanca (Zhang et al., 2008), mientras que el nivel de expresión del gen CAT en *Scylla paramamosa* aumentó significativamente después de la estimulación con lipopolisacáridos (Liu et al., 2010).

- *Superóxido dismutasas (SOD)*

La SOD es una metaloenzima que cataliza la dismutación del radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, protegiendo frente a la toxicidad del anión superóxido, a través de la siguiente reacción:



El peróxido de hidrógeno generado puede a su vez ser eliminado por la acción de CAT (Matés, 2000).

En función de la presencia de distintos metales en el sitio activo de la enzima, se determinan cuatro clases de SOD: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD y Ni-SOD. El primer grupo contiene Cu (II) y Zn (II) en su sitio activo y generalmente se encuentra en el citosol de células eucariotas, en cloroplastos y en algunos procariotas. El segundo, posee Mn (III) y se halla en procariotas y mitocondrias. La tercera clase corresponde a la Fe-SOD, con Fe (III) en su sitio activo, se encuentra en procariotas, algas y en algunos cloroplastos de plantas superiores. La cuarta clase, constituida por la Ni-SOD con Ni (II/III), ha sido aislada en el género *Streptomyces* (Scandalios, 2005). La actividad SOD varía ampliamente en los invertebrados y, generalmente, es más baja que en los vertebrados (Livingstone et al., 1992).

Las enzimas SOD desempeñan un rol importante en la respuesta al estrés oxidativo celular de invertebrados. Una de las características importantes de estas enzimas es que se inducen bajo condiciones de estrés oxidativo, y tal inducción puede ser una adaptación importante al estrés inducido por contaminantes (Scandalios, 2005). Varios estudios han revelado un incremento en la actividad de SOD por exposición a hidrocarburos (Zhang et al., 2004b; Lavarías et al., 2011).

1.6.2. Enzimas de conjugación

- *Glutación S-Transferasas (GST)*

Las GST son un grupo de enzimas que catalizan la conjugación del GSH con una amplia variedad de compuestos electrofílicos (Habig et al., 1974). En forma directa o indirecta, las GST involucran una serie de diferentes mecanismos que protegen contra el daño oxidativo causado por radicales libres (Kim et al., 2009). Además de ser un grupo enzimático de conjugación, algunas isoenzimas GST están involucradas en la regulación del equilibrio o balance redox (defensa antioxidante).

Constituyen una superfamilia de proteínas muy diversa, las cuales se pueden clasificar según su distribución celular en citosólica, mitocondrial y microsómica (Sheehan et al., 2001). La clase citosólica está principalmente involucrada en la detoxificación celular y posee seis subclases (delta δ , epsilon ϵ , omega ω , sigma σ , theta θ , mu μ y zeta Z). La GST de clase σ fue estudiada en el cladóceros *Daphnia pulex* (Colbourne et al., 2011). Arockiaraj et al. (2014) informaron la caracterización molecular de GST- θ en crustáceos de agua dulce de la especie *Macrobrachium rosenbergii*.

La clase mitocondrial (también conocida como GST Kappa) está conformada por enzimas solubles con especificidades de sustrato similares a las GST citosólicas. En crustáceos, esta clase ha sido reportada para *D. pulex* (Colbourne et al., 2011) y el copépodo *Tigriopus japonicus* (Lee et al., 2008). Chaurasia et al. (2016) reportaron GST δ y kappa en el camarón de agua dulce *M. rosenbergii*.

El tercer grupo lo constituyen las GST microsomales, que pueden definirse como proteínas asociadas a la membrana e involucradas en el metabolismo de eicosanoides y glutatión. Roncalli et al. (2015) determinaron en el crustáceo *Calanus finmarchicus* secuencias de proteínas que incluyeron miembros de las tres clases de GST, citosólica, mitocondrial y microsomal, con la mayor diversidad observada en la clase citosólica.

- *Sulfotransferasas (ST)*

Las ST son enzimas citosólicas que conjugan al xenobiótico (X) o sustrato endógeno con un grupo sulfonato (SO_3^-) que proviene del compuesto activado 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS). El PAPS se forma enzimáticamente a partir de adenosina trifosfato (ATP) y un sulfato inorgánico.

Los principales grupos funcionales que se conjugan con los sulfonatos son los hidroxilos y aminos. La reacción del xenobiótico con PAPS catalizada por la ST se describe a continuación:



El producto de esta reacción es un sulfato orgánico ionizado, muy soluble en agua (Nikinmaa, 2014).

Los organismos acuáticos tienen una predisposición a transformar los xenobióticos en conjugados de sulfato como los principales metabolitos formados a través de las reacciones de conjugación. Esta tendencia va a depender de la concentración de iones sulfato en el ambiente acuático. Como se considera que el ambiente acuático constituye un reservorio importante de iones sulfato, la formación de conjugados de sulfato durante las reacciones de conjugación, puede deberse a la evolución y adaptación de los organismos a ese medio (Ikenaka et al., 2006). En crustáceos, varios estudios han

demostrado la importancia de la conjugación, especialmente mediante las ST, en el metabolismo y eliminación de hidrocarburos (Li & James, 1993; Ikenaka et al., 2006).

1.6.3. Enzimas hidrolíticas

- *Esterasas (EST)*

Las EST son enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres, lo cual da como producto un alcohol y un ácido. Generalmente, las reacciones de hidrólisis conducen a la formación de metabolitos más solubles.

Estas enzimas se encuentran involucradas en importantes procesos fisiológicos, que incluyen la digestión, reproducción, procesos de desarrollo y detoxificación y tolerancia a muchos xenobióticos. Además, constituyen un componente importante del sistema de defensa frente a diversos contaminantes. Las EST se han estudiado extensamente en diferentes grupos de animales. Sin embargo, el estudio de la actividad de estas enzimas en crustáceos continúa siendo escaso (Lima et al., 2013).

Algunos trabajos mostraron que la exposición a hidrocarburos en organismos acuáticos produce una reducción en la actividad de EST, en particular de la acetilcolinesterasa (AChE) (Akaishi et al., 2004; Bocquené et al., 2004). En crustáceos, Rodrigues et al. (2013) demostraron que los PAHs son inhibidores potenciales de la actividad EST, aunque el mecanismo de acción no está del todo claro aún. Sin embargo, se sabe que los inhibidores por excelencia de estas enzimas son los plaguicidas organofosforados y carbamatos (Wheelock et al., 2008).

- *Epóxido hidrolasas (EH)*

Las EH son enzimas que catalizan la adición de moléculas de agua a los epóxidos y los detoxifican a dioles. A menudo, estos epóxidos se producen a partir de la oxidación previa de un xenobiótico por las CYP450. Se encuentran principalmente presentes en el retículo endoplásmico, pero algunas isoformas están localizadas en el citosol (Nikinmaa, 2014). Se han estudiado, en peces expuestos a PAHs, los mecanismos de detoxificación que involucran la conversión a epóxidos y posteriormente a dioles por la acción combinada de las CYP450 y las epóxido hidrolasas (Pangrekar et al., 2003).

1.6.4. Compuestos antioxidantes no enzimáticos

Un antioxidante puede definirse como cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparada con el sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de tal sustrato (Halliwell & Gutteridge, 1995). Dentro del sistema antioxidante no enzimático se encuentran compuestos como el GSH, los carotenoides, α -tocoferol, ácido ascórbico, etcétera.

- *Glutación reducido (GSH)*

El GSH es un tripéptido hidrosoluble (gamma-glutamil-cisteinil-glicina) que está constituido por tres aminoácidos, cisteína, glutamato y glicina. La parte activa de la molécula es el grupo tiol (grupo SH) de la cisteína. Existe en dos formas, reducida (GSH) y oxidada (GSSG). Esta molécula tiene una participación clave en varios procesos celulares, siendo fundamental para la supervivencia celular. Desempeña un rol importante en la defensa antioxidante, el metabolismo de xenobióticos y la regulación del ciclo celular y la expresión génica.

En situaciones de estrés oxidativo, el GSH puede reaccionar directamente con los radicales libres o reducir los peróxidos a través de la glutación peroxidasa (GPx), formando GSSG por unión de dos moléculas de GSH a través de un puente disulfuro entre las cisteínas. El GSSG es inmediatamente reducido a GSH por medio de la enzima glutación reductasa (GR), utilizando NADPH como cofactor (Sies, 1999).

El potencial antioxidante se midió en muchos organismos acuáticos y generalmente es un elemento de monitoreo de generación de radicales libres por la exposición a hidrocarburos (Hasselberg et al., 2004; Hughes & Gallagher, 2004).

- *Carotenoides*

Los carotenoides constituyen una familia de polienos conjugados que son sintetizados por plantas, algas y ciertos tipos de bacterias y hongos. Al igual que la mayoría de los animales, los crustáceos son incapaces de sintetizar carotenoides, por lo que deben obtenerlos a través de sus dietas. Los anfípodos almacenan cantidades relativamente grandes de carotenoides en sus tejidos y como gotas de lípidos en la hemolinfa (Dembitsky & Rezanka, 1996; Gaillard et al., 2004).

Las funciones principales de los carotenoides en crustáceos se han atribuido a pigmentación, fotooxidación, como precursores o fuente de la vitamina A y antioxidantes. Su importante actividad antioxidante se debe a que poseen la capacidad de reaccionar con el oxígeno singlete e inhibir la peroxidación de los lípidos (Fernández-Gimenez et al., 2016).

Algunos estudios han demostrado un incremento en el crecimiento y supervivencia de camarones cuando son alimentados con una dieta que contiene carotenoides (Zhang et al., 2013; Zelati et al., 2016).

- *α-Tocoferol (vitamina E)*

El α -Tocoferol es una vitamina lipofílica y se encuentra en el compartimiento de membranas y lipoproteínas. Se considera un nutriente dietario esencial para los crustáceos (Conklin, 1997). Actúa principalmente como un antioxidante lipófilo que protege las membranas de las células y los orgánulos de la oxidación mediante la eliminación de radicales libres orgánicos. Esta función puede ser especialmente importante durante el desarrollo embrionario y larvario (Du et al., 2006).

Se ha reportado que la incorporación de vitamina E a la dieta del crustáceo *Litopenaeus vannamei* mejoró el desarrollo larval (Wouters et al., 2001) y aumentó las tasas de fertilización y de eclosión de los huevos (Du et al., 2006). Nguyen et al. (2012) informaron que el suplemento de vitamina E mejora el rendimiento reproductivo y las tasas de metamorfosis de nauplios en el camarón *Marsupenaeus japonicus*.

- *Ácido ascórbico (vitamina C)*

El ácido ascórbico (vitamina C) es una vitamina soluble en agua requerida como cofactor de varias enzimas. Proporciona capacidad antioxidante intracelular y extracelular en fase acuosa a través de la eliminación de radicales libres, debido a su habilidad de donar dos electrones. La donación de un electrón del ácido ascórbico produce el radical del ácido monodeshidroascorbato, que luego es oxidado a ácido deshidroascorbato. En presencia de GSH, el ácido deshidroascorbato es reciclado a ascorbato por medio de la enzima deshidroascorbato reductasa.

Las EROS se reducen a partir del ascorbato, formando primero monodeshidroascorbato y luego deshidroascorbato. Las EROS son reducidas a agua, mientras que las formas

oxidadas del ascorbato son relativamente estables y no reactivas, por lo que no causan daño celular (Shiau, 2001).

La mayoría de las especies de crustáceos no pueden sintetizar vitamina C debido a la falta de la enzima L-gulonolactona oxidasa, que es necesaria para su biosíntesis. Por lo tanto, dependen del suministro de vitamina C a través de la alimentación. Las dietas suplementadas con esta vitamina pueden mejorar el crecimiento, la supervivencia, la reproducción, la eficiencia alimenticia, la muda, la resistencia al estrés y la respuesta inmune en los crustáceos (Cavalli et al., 2001; Asaikkutti et al., 2016).

1.7. Biomarcadores

Los efectos deletéreos producidos por contaminantes o mezclas de ellos sobre las poblaciones o ecosistemas son difíciles de detectar en forma temprana porque gran parte de los mismos tienden a manifestarse a largo plazo. Esto último pone de manifiesto la utilidad de biomarcadores bioquímicos como señales de alarma tempranas, evidenciando las respuestas biológicas debido a la exposición a sustancias tóxicas de origen antropogénico o natural.

Los biomarcadores se definen como una alteración o manifestación bioquímica, histológica o fisiológica que refleja cambios en la condición de salud de un organismo o población como resultado de la exposición a tóxicos. Los biomarcadores representan el intento de un organismo de compensar o tolerar los factores de estrés en el medio ambiente (Cormier et al., 1994; Boudou & Ribeyre, 1997; Chambers et al., 2002).

Se pueden clasificar en biomarcadores de exposición, de efecto y de susceptibilidad (WHO, 1993). Los biomarcadores de exposición hacen referencia a la identificación de un xenobiótico dentro del organismo (dosis interna), el producto de la interacción del xenobiótico y componentes endógenos, u otro evento en el sistema biológico relacionado con la exposición (WHO, 1993). Indican que un organismo o una población está o ha estado expuesto a un tóxico u otro agente estresante. Sin embargo, el cambio en el biomarcador no necesariamente está relacionado directamente con el mecanismo de acción específico del tóxico y puede no ser predictivo del grado de efecto adverso sobre el organismo o la población (Chambers et al., 2002). Este tipo de biomarcadores permiten la medición de la dosis interna del compuesto o metabolito tóxico en fluidos corporales como sangre o excretas, orina y aire expirado mediante el análisis químico. La dosis interna también puede representar la cantidad de un compuesto químico almacenado en

uno o varios compartimentos corporales o en todo el cuerpo. Estos biomarcadores se utilizan generalmente para estudiar a los compuestos químicos tóxicos que se bioacumulan (Gil & Pla, 2001).

Bernard & Lauwerys (1986) clasificaron a los biomarcadores de exposición en dos subgrupos: selectivos y no selectivos, en función de su prueba de selectividad. Los biomarcadores selectivos se basan en la medición directa de los compuestos químicos inalterados o sus metabolitos en un medio biológico. Los biomarcadores no selectivos se usan como indicadores no específicos de exposición a un grupo de químicos.

Los biomarcadores de efecto se definen como cualquier cambio bioquímico, fisiológico u otro tipo dentro de un organismo que puede resultar en un daño establecido o potencial para la salud del organismo (WHO, 1993). Están relacionados de forma específica con el mecanismo de acción del compuesto tóxico y caracterizados para relacionar el grado de modificación del biomarcador con el nivel del efecto adverso (Chambers et al., 2002). Estos biomarcadores incluyen modificaciones en algunos parámetros de la composición sanguínea, alteraciones de actividades enzimáticas específicas, la aparición de aductos de ADN, aumento del ARNm y la aparición de anticuerpos específicos contra un xenobiótico, entre otros (Gil & Pla, 2001). Entre los marcadores de efecto se encuentran los biomarcadores enzimáticos, los cuales involucran enzimas que participan en la detoxificación de un xenobiótico o sus metabolitos (Van der Oost et al., 2003).

Los biomarcadores de susceptibilidad son indicadores de la capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder a la exposición a un xenobiótico (WHO, 1993). Este tercer tipo de biomarcador es el más usado en medicina para predecir la susceptibilidad individual a desarrollar un determinado daño (por ejemplo: genes que predisponen a un individuo a la esclerosis múltiple). Dichos biomarcadores son también de utilidad en la evaluación de riesgos para identificar individuos sensibles o poblaciones que tienen una susceptibilidad única a la acción de un tóxico (Chambers et al., 2002).

Los biomarcadores pueden integrar en una matriz espacio-temporal distintos episodios de exposición a uno o múltiples tóxicos. Además, permiten monitorear, de manera muy sensible, los efectos de un tóxico aún a concentraciones muy por debajo de las que provocan alteraciones fisiológicas y letales (Rosenbaum et al., 2012). Por esta razón, constituyen una herramienta muy útil en los programas de monitoreo ambiental y evaluación de riesgos.

Dado que los biomarcadores muestran que la exposición y absorción ocurrieron, evidenciando una respuesta biológica a los xenobióticos, pueden utilizarse para predecir

los resultados de la exposición al petróleo (Coppock & Dziwenka, 2014). La regulación positiva de las enzimas CYP450 es considerado un biomarcador de exposición y respuesta biológica a los xenobióticos que se unen al AhR (Brown et al., 2008; Martínez-Gómez et al., 2009). Dicha regulación positiva de las enzimas CYP450, especialmente CYP4501A, se produce después de la exposición a hidrocarburos y otros compuestos estructuralmente relacionados, a través de la síntesis *de novo* de proteínas. Las enzimas CYP450 pueden medirse por métodos de expresión génica (ARNm), medición de las proteínas CYP450 con anticuerpos monoclonales u otros métodos específicos, y midiendo la actividad enzimática utilizando sustratos específicos. La inducción de la actividad CYP450, determinada mediante la reacción de O-dealquilación del sustrato 7-etoxiresorufina (EROD) o 7-etoxicoumarina (ECOD), se ha utilizado ampliamente como un biomarcador de efecto (Cheikyula et al., 2008; Martínez-Gómez et al., 2009). Se ha reportado la inducción de la isoforma CYP4501A por PAHs y otros hidrocarburos alifáticos (Petrulis & Bunce, 2000; Arzuaga et al., 2006; Nannelli et al., 2009). También se observó la expresión de esta isoforma y otras de CYP, como 1C, 2D, 2J y 2P, mediante técnicas de microarray y RNAseq en forma asociada al derrame de petróleo crudo en el Golfo de México, y particularmente la expresión de proteína CYP1A, aún dos meses después del accidente, en el pez killi (*F. grandis*) (Whitehead et al., 2012).

El uso de biomarcadores moleculares ha tenido un avance muy importante en los últimos años, a partir del estudio de transcriptomas, proteomas, metabolomas, entre otros (North & Vulpe, 2010).

1.8. *Hyalella curvispina* como especie modelo en estudios toxicológicos

La especie seleccionada para los estudios toxicológicos debe reunir determinadas condiciones como relevancia ambiental, distribución geográfica amplia, importancia ecológica, abundancia durante todo el año, facilidad en el cultivo y mantenimiento en laboratorio, sensibilidad a sustancias tóxicas y tiempos cortos de generación (EPA, 2000). Generalmente, en los ensayos de toxicidad se utilizan diferentes especies de crustáceos, insectos y anélidos (Ingersoll, 1995). Dentro de los crustáceos, los anfípodos son ampliamente utilizados debido a su sensibilidad a diferentes xenobióticos y a que se consideran importantes bioindicadores de la calidad del ecosistema acuático (Jergentz et al., 2004; Borgmann et al., 2005; Wheelock et al., 2005). En los últimos años, se ha

utilizado a este anfípodo para evaluar la toxicidad de diversos contaminantes, tanto en condiciones de laboratorio como de campo (Anguiano et al., 2008; Peluso et al., 2011; Giusto et al., 2012).

En el presente estudio, se seleccionó al crustáceo autóctono *Hyaella curvispina* como especie modelo, debido a que reúne todas las características para ser utilizado en estudios toxicológicos y por haber sido usado anteriormente en el laboratorio (CITACC) en estudios toxicológicos y bioquímicos (Anguiano et al., 2012, 2017).

1.8.1. Clasificación sistemática

La tabla 1.2 muestra la clasificación sistemática de la especie *H. curvispina*.

Tabla 1.2: Clasificación sistemática de la especie *H. curvispina*.

<i>Clasificación sistemática</i>	
<i>Subfilum</i>	Crustacea
<i>Clase</i>	Malacostraca
<i>Subclase</i>	Eumalacostraca
<i>Orden</i>	Amphipoda
<i>Suborden</i>	Gammaridea
<i>Familia</i>	Dogielinotidae
<i>Género</i>	<i>Hyaella</i> Smith
<i>Especie</i>	<i>Hyaella curvispina</i> Shoemaker

1.8.2. Distribución geográfica y hábitat

Los anfípodos de agua dulce *H. curvispina* tienen una amplia distribución en América del Sur, desde Punta Arenas, Chile y las Islas Malvinas en el Sur, hasta Cangallo y Río de Janeiro en el Norte. Se los encuentra asociados a diversos hábitats de agua dulce tales

como lagos, lagunas y arroyos, e incluso en aguas subterráneas donde se encuentran a veces en grandes cantidades. Integran diversas comunidades, como el pleuston, heteroplocon y bentos. En general, constituyen una importante fracción de la biomasa total de macroinvertebrados (Grosso & Peralta, 1999).

1.8.3. Biología

Los anfípodos se alimentan principalmente de detritos, algas, bacterias asociados al sedimento y de plantas macrófitas. Como detritívoros, cumplen un rol clave en el ciclo de los nutrientes en sistemas de agua dulce y constituyen una presa importante de muchas especies de organismos acuáticos (Grosso & Peralta, 1999).

Los adultos tienen una longitud que varía entre 2,5 a 20 mm, sin considerar las antenas. Presentan el cuerpo dividido en tres regiones, el cefalotórax, el pereion (tórax) y el pleon (abdomen) (Figura 1.4).

El cefalotórax está formado por la unión de la cabeza y el primer toracómero, y contiene ojos compuestos sésiles, dos pares de antenas y las piezas bucales. Los dos pares de antenas se encuentran bien desarrollados.

El pereion comprende siete segmentos, en cada uno de los cuales hay un par de pereiópodos (patas). Los dos primeros pares se denominan gnatópodos, los cuales presentan un dimorfismo sexual marcado. En los machos, se evidencia por el desarrollo pronunciado del propodo del segundo par de gnatópodos, el cual es utilizado para transportar a la hembra durante el ciclo reproductivo y para la copulación. Los gnatópodos, además de cumplir un rol fundamental durante la cópula, son usados para la alimentación, el enterramiento, la construcción de tubos y la higiene de las piezas bucales. Las hembras presentan en el pereion un par de ovarios y cuando ocurre la fecundación puede identificarse la presencia de un marsupio con huevos dentro del mismo.

El pleon se encuentra formado por el pleosoma y el urosoma. El primero contiene apéndices llamados pleópodos que se utilizan para la natación y ventilación. El segundo, contiene urópodos, los cuales se usan principalmente para saltar, aunque también pueden asistir en la cópula, la natación y la excavación. A continuación del pleon se encuentra el telson, el cual protege al ano (Barnard & Karaman, 1991; Bellan-Santini, 1999).

La reproducción de los anfípodos comienza con una fase de precópula. El amplexo se forma hacia el final del período de intermuda de la hembra y continúa hasta su muda. Luego, se liberan los oocitos dentro del marsupio, y al poco tiempo ocurre la cópula.

Durante la misma, el macho deposita su esperma en el marsupio para que se produzca la fertilización. Las hembras conservan los oocitos fecundados hasta la eclosión de los juveniles, los cuales son liberados cuando completan su desarrollo (Bellan-Santini, 1999).

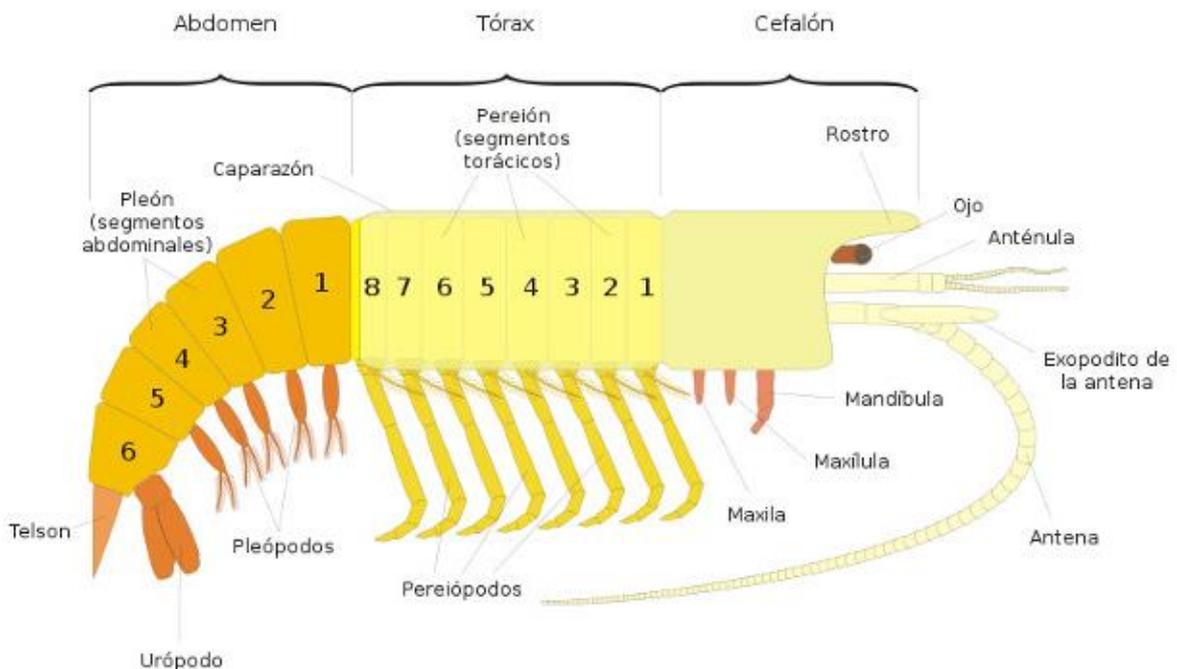


Figura 1.4: Anatomía de un crustáceo típico en vista lateral. Adaptada de Hans Hillewaert. Licencia CC-by-sa. Fuente: Wikipedia.

1.9. Actividad hidrocarbúrfica en la región

La principal actividad productiva de la provincia de Neuquén es la explotación de hidrocarburos. La Cuenca Neuquina tiene una superficie aproximada de 124.000 km² y abarca gran parte de la provincia del Neuquén, el sector occidental de la provincia de Río Negro y La Pampa y la porción suroccidental de la provincia de Mendoza. Cuenta con cuatro oleoductos principales, cuyos destinos son Río Negro, Buenos Aires, Mendoza y República de Chile; y tres gasoductos con ramales a Chile y a las provincias de Mendoza, San Luis, Santa Fe y Buenos Aires (Secretaría de Estado de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la Provincia de Neuquén, 2013).

En el año 2017, la producción de petróleo y gas en Argentina alcanzó los 72.395 Mm³, de los cuales la Cuenca Neuquina contribuyó un 52% del total producido. Este porcentaje la convierte en una de las zonas petroleras y gasíferas más importante del país (Informe anual de hidrocarburos año 2017, 2018). Dentro de la Cuenca Neuquina, particularmente la provincia de Neuquén, aporta alrededor del 20% de petróleo y el 43% de gas producido en el país (Ministerio de Hacienda, Secretaría de Hacienda, Dirección Nacional de Asuntos Provinciales, 2018).

A pesar de las regulaciones y programas de monitoreo, implementados en diferentes etapas de la producción de petróleo (exploración y explotación), los derrames de petróleo crudo han causado contaminación de suelos y aguas en la región (Secretaría de Estado de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la Provincia de Neuquén, 2013). Se han detectado hidrocarburos de petróleo, como naftaleno y pireno, en muestras de agua y sedimentos de diferentes sitios de Neuquén (Monza et al., 2013).

Hipótesis y Objetivos

2. HIPÓTESIS

La especie autóctona *H. curvispina* es capaz de desarrollar una respuesta adaptativa frente a la exposición a contaminantes derivados de los procesos extractivos de gas y petróleo, siendo adecuada como especie bioindicadora en evaluaciones de impacto ambiental.

Mecanismos moleculares y bioquímicos tales como la señalización a través del receptor de hidrocarburos de arilo AhR, su unión a ADN en el elemento de respuesta a xenobióticos o dioxinas XRE/DRE, y el control de la expresión de enzimas de detoxificación como citocromo P450 (isoformas de CYP1A entre otras), y enzimas antioxidantes como catalasa y glutatión S-transferasa son desencadenados por la exposición a hidrocarburos.

Los análisis de transcritos de isoformas de CYP o de enzimas detoxificantes en especímenes de *H. curvispina* recolectados a campo pueden ser empleados como biomarcadores frente a contaminantes provenientes de la actividad hidrocarburífera.

3. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la potencialidad de *H. curvispina* como especie bioindicadora de la calidad ambiental en zonas de producción hidrocarburífera Norpatagónica mediante el uso de biomarcadores moleculares.

Objetivos Específicos

- 1.** Determinar cuali y cuantitativamente los componentes de la WAF de un crudo extraído de la cuenca Norpatagónica.
- 2.** Determinar la disipación en el tiempo de cada componente de la WAF.
- 3.** Evaluar la toxicidad aguda y crónica de WAF en anfípodos de la especie *H. curvispina* provenientes de un área de referencia y un sitio con antecedentes de contaminación con hidrocarburos.
- 4.** Evaluar en ambas poblaciones los efectos producidos por la exposición a WAF en el contenido de GSH y actividades GST, CAT y CYP450.
- 5.** Determinar la expresión de CYP450.
- 6.** A partir de los resultados obtenidos, identificar un biomarcador adecuado de exposición a WAF.

Objetivo Tecnológico

Obtener, a partir del desarrollo de biomarcadores moleculares, un producto patentable o transferible a empresas u organismos gubernamentales como herramienta para el control ambiental en áreas de explotación hidrocarburífera.

Materiales y Métodos

4. MATERIALES Y MÉTODOS

En la figura 4.1 se esquematiza el diseño de la metodología general de trabajo.

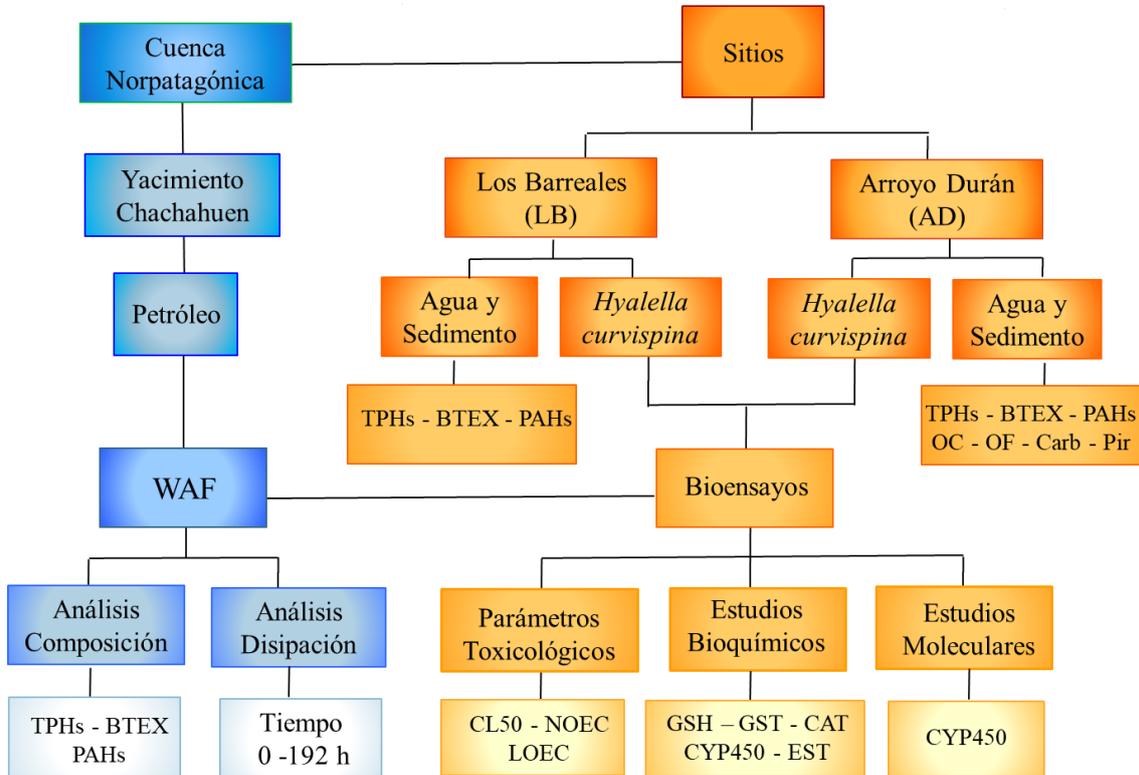


Figura 4.1: Diseño de la metodología general de trabajo.

4.1. Reactivos utilizados

Glutación reducido (GSH), 7-etoxicumarina (7-EC), 7-hidroxycoumarina (7-OHC), 1-cloro-2,4-dinitro benceno (CDNB), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), α -naftil acetato (α -NA), Fast Garnet GBC, tetrametil etilén diamina (TEMED), glicina y albúmina de suero bovina fueron comprados a Sigma-Aldrich, Argentina S.A. (Buenos Aires). La solución Folin Ciocalteu, los ácidos etilén diamino tetra-acético (EDTA), tricloro acético (TCA), tiobarbitúrico y el peróxido de hidrógeno fueron provistos por Anedra, Argentina (Buenos Aires).

4.2. Preparación de la Fracción Acomodada en Agua de Petróleo (WAF)

La WAF se obtuvo a partir de petróleo crudo extraído del pozo Chachahuen, ubicado en la cuenca neuquina en Patagonia Norte. La WAF se preparó de acuerdo con el método descrito por Heras et al. (1992), con algunas modificaciones. Una parte de petróleo crudo se añadió a cien partes de agua dulce filtrada (1:100, v/v) en un matraz de 3 L. Se homogeneizó en la oscuridad utilizando un agitador magnético a bajas revoluciones (60 rpm) durante 24 h. Luego, la mezcla se transfirió a una ampolla de decantación, donde se dejaron separar las fases durante 48 h. Finalmente, la fase inferior (WAF) se recogió y almacenó a 4 °C. La WAF se analizó por cromatografía gaseosa (CG) (ver 4.4.1) para determinar la concentración total de hidrocarburos (TPHs), la que se denominó WAF 100% (Figura 4.2). A partir de ella se realizaron diluciones con agua filtrada para los ensayos individuales. La WAF se preparó inmediatamente antes de comenzar cada serie de ensayos.



Figura 4.2: Preparación de la WAF. (Izq.) Mezcla de petróleo y agua en agitador. (Der.) Ampolla de decantación en la cual se observan las dos fases: petróleo (superior) y WAF (inferior).

4.3. Área de estudio

El área de estudio incluyó dos sitios de la provincia de Neuquén, lago Los Barreales (LB) y arroyo Durán (AD) (Figura 4.3). Los Barreales es un lago artificial permanente que recibe, mediante una derivación antrópica, los aportes del río Neuquén con el fin de atenuar las crecidas (S 38° 45' 34,4"; O 68° 72' 91,8"). Desagua hacia el embalse Marí Menuco, junto con el cual conforman el complejo Cerros Colorados (<http://iarh.org.ar/Lagos/BARREALES.pdf>). Su estado trófico es mesotrófico y presenta un lecho arenoso (Sánchez et al., 2013). A su alrededor, la vegetación está dominada por la estepa o matorral arbustivo, consistente en especies achaparradas, espinosas y resinosas. Está situado a unos 100 km del área de producción frutícola, por lo que no hay probabilidad de exposición a plaguicidas y las concentraciones de PAHs se encontraron por debajo de los límites de detección (Monza et al., 2013). Por lo tanto, a LB se lo considera un ambiente sin contaminación antrópica, adecuado como provisión de organismos para su utilización en ensayos de toxicidad en laboratorio.

El arroyo Durán se origina de una interconexión subálvea sobre un paleocauce del río Limay, para desembocar en el mismo luego de recorrer aproximadamente 10 km por el sector sur de la ciudad de Neuquén (S 38° 58' 20,60"; O 68° 06' 03,10") (Figura 4.4). Recibe afluentes de diversas subcuencas de aporte, siendo las principales Canal 5, Rivas y Bejarano. Las márgenes del arroyo presentan una densa vegetación ribereña formada principalmente por sauces de gran tamaño. Las zonas de mayor profundidad poseen vegetación acuática abundante (principalmente *Egeria densa*).

En la actualidad, dado el vertiginoso crecimiento de la ciudad de Neuquén, el arroyo es utilizado como un receptor de cuerpos de aguas pluvio-aluvionales y desagües de riego, como así también de conexiones clandestinas de industrias asentadas en las márgenes del mismo. El área está expuesta a numerosos contaminantes, habiéndose informado previamente concentraciones de naftaleno y pireno en agua y sedimentos de AD (Monza et al., 2013). Es por ello, que el arroyo requiere una urgente evaluación de los efectos toxicológicos de los hidrocarburos.

Por otra parte, aguas arriba el sitio AD está rodeado por unas pocas huertas familiares donde los agricultores podrían usar agroquímicos para mejorar la producción de cultivos. Por lo tanto, los análisis de plaguicidas se incluyeron en este sitio.

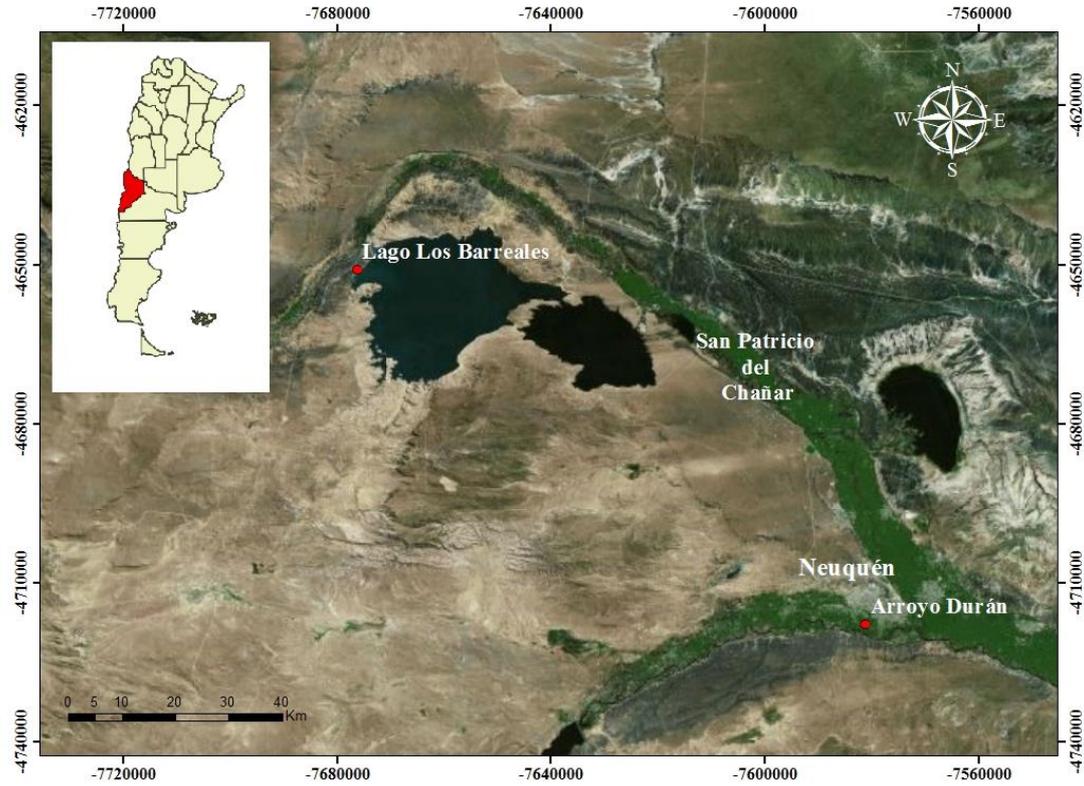


Figura 4.3: Mapa de la ubicación del lago Los Barreales y el arroyo Durán.

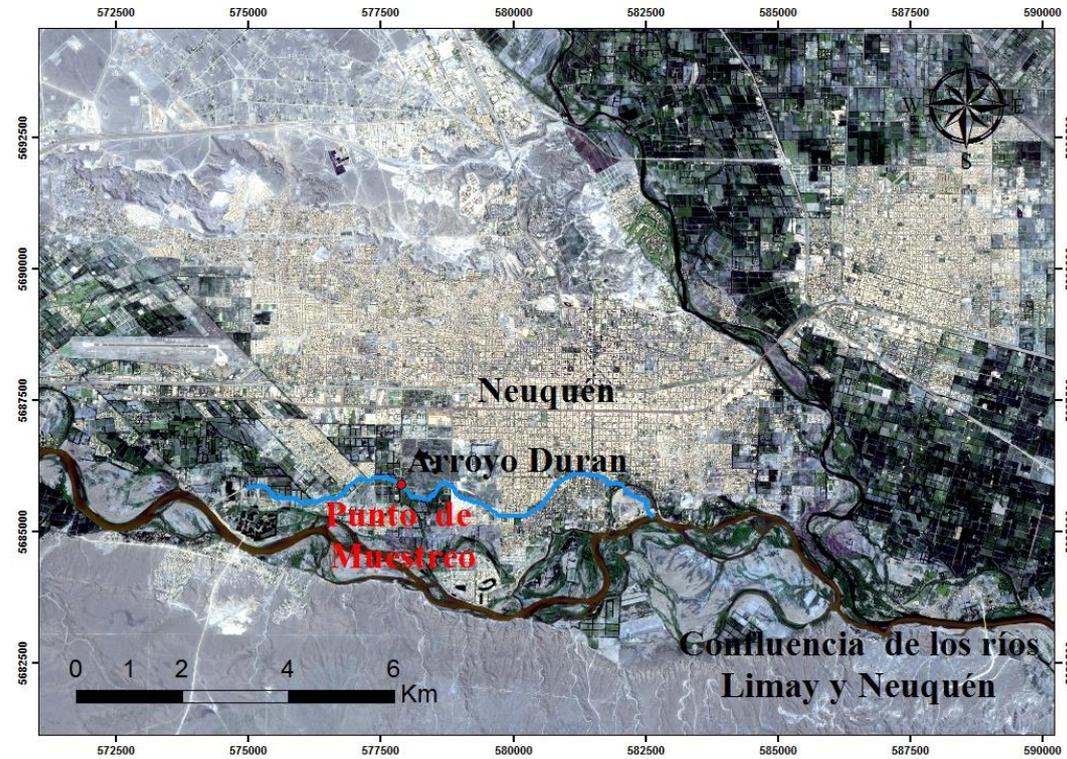


Figura 4.4: Localización del punto de muestreo en el arroyo Durán.

4.3.1. Recolección de muestras de agua y sedimentos

En cada sitio de muestreo, se midieron *in situ* parámetros físico-químicos tales como pH, conductividad, oxígeno disuelto y temperatura con una sonda multiparamétrica (Lutron YK 2001PH). Se tomaron muestras de sedimentos y agua de cada sitio de muestreo de acuerdo con metodologías estandarizadas (EPA, 2007) en el mes de febrero de 2016. Las muestras de agua se recolectaron directamente en botellas de vidrio color ámbar (1 L), con la abertura orientada en contracorriente y a una profundidad de 20 cm de la superficie. Las muestras de sedimentos se tomaron en los primeros centímetros de la superficie del suelo (0-3 cm) con una cuchara de acero inoxidable y se colocaron en frascos de vidrio (1 kg). Se obtuvieron un mínimo de cinco sub-muestras de sedimentos en cada sitio de muestreo, las cuales fueron integradas en el frasco conformando una única muestra compuesta representativa de cada sitio. Las mismas se transportaron en una conservadora a 4 °C hasta el laboratorio. Los sedimentos se homogeneizaron y se eliminaron aquellos restos grandes tales como grava y organismos. Las muestras de agua se procesaron inmediatamente y las de sedimentos se almacenaron en el congelador a -20 °C hasta su análisis.

4.3.1.1. Determinación del porcentaje de humedad en muestras de sedimentos

Para determinar el contenido de humedad del sedimento se pesaron 20 g de las muestras en vasos de precipitado y se secaron en estufa a 100 °C durante 24 h (ASTM D2216). El porcentaje de humedad se calculó de acuerdo a la siguiente expresión:

Peso suelo húmedo – Peso suelo seco = Peso humedad

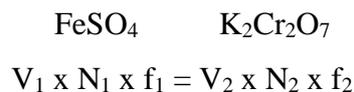
% Humedad = (Peso humedad/Peso suelo húmedo) x 100

4.3.1.2. Determinación de materia orgánica en muestras de sedimentos

La determinación de materia orgánica se realizó mediante el método propuesto por Walkley & Black (1934). Se pesaron 0,5 g de sedimentos, se molieron y se tamizaron a través de un tamiz de 300 µm. Se agregaron 5 mL de solución de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) 1 N y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄). Luego, se dejaron

reposar durante 30 min y se agregaron 100 mL de agua destilada, 5 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) al 85% y 1,5 mL de difenilamina 0,025 N. Una vez añadidas todas estas soluciones, se titularon con sulfato ferroso (FeSO_4) 0,5 N. En la titulación, se obtuvo primero una solución color café que luego pasó a color azul y, finalmente, viró de azul a verde. De la misma forma, se valoró una solución testigo con 5 mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Valoración del f del FeSO_4 0,5 N:



V_1 : Titulación del blanco

N_1 : Normalidad de FeSO_4

V_2 : Volumen de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

N_2 : Normalidad de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

f_2 : factor del $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

$$\text{SO}_4 \text{ equivalentes} = V \times N \times f$$

V: volumen de FeSO_4

N: Normalidad de FeSO_4

Cromato consumido ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) = mL $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ - SO_4 equivalentes

% Materia orgánica = Cromato consumido ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) x 0,69 / [g de muestra x (0D/AD)]

0D/AD: Relación peso de suelo seco en estufa / peso de suelo seco al aire

4.3.2. Organismos

Los individuos de *H. curvispina* se recolectaron en ambos sitios durante los meses de febrero y marzo, época correspondiente a la de mayor biomasa de anfípodos. Los organismos (tanto juveniles como adultos) se obtuvieron utilizando una red de trama fina con una abertura de malla de 0,5 mm, donde quedaban retenidos junto con otros

macroinvertebrados y flora acompañante presentes en el sitio de muestreo. Cada muestra obtenida con la red se colocó en recipientes plásticos, los cuales contenían agua del mismo sitio para luego ser trasladados al laboratorio. Una vez en el laboratorio, se dispusieron en bateas y se procedió a la separación de los anfípodos mediante pipetas plásticas de boca lo suficientemente ancha, para evitar dañarlos. Luego, los anfípodos se mantuvieron en la sala de organismos acuáticos en peceras de vidrio con agua de su propio sitio, la cual fue reemplazada gradualmente por agua filtrada. Se mantuvieron a temperatura constante de 21 ± 1 °C y un régimen de fotoperíodo de 16:8 h L:O con aireación constante. Se utilizó alimento comercial para peces *ad libitum*. Los anfípodos provenientes de LB se mantuvieron en condiciones de laboratorio, promoviendo la reproducción. Una vez al año, el cultivo fue enriquecido con la entrada de nuevos individuos, a fin de recomponer la población. Los anfípodos provenientes de AD fueron utilizados antes de las dos semanas de su recolección para los ensayos (previa aclimatación en el laboratorio) con el fin de evitar posibles modificaciones en las actividades enzimáticas basales.

4.4. Métodos analíticos

4.4.1. Hidrocarburos

El análisis de hidrocarburos fue realizado mediante una modificación del método EPH-04; Revisión 1.1 (MADEP - Massachusetts Department of Environmental Protection State Agency, 2004).

Las muestras de agua (1 L) fueron extraídas según el método SW 846-3510C con 3 volúmenes de 60 mL de cloruro de metileno, agitando durante 3 min cada vez y dejando separar las fases durante 10 min, entre cada proceso de extracción. Las muestras de sedimento (10 g) fueron extraídas según el método SW 846-3550C, mediante un equipo Soxhlet con 150 mL de cloruro de metileno durante 16 h, 3-4 ciclos por hora.

Los extractos se concentraron en un evaporador rotatorio y se intercambiaron el solvente a hexano. El fraccionamiento de hidrocarburos alifáticos (HA) y de PAHs se llevó a cabo utilizando una columna empacada de sílica gel. La fracción HA (F1) se eluyó con 20 mL de n-hexano y una segunda fracción (F2), para la separación de PAHs, se eluyó con 20 mL de diclorometano.

Finalmente, cada fracción se concentró mediante corriente de nitrógeno a un volumen de 1 mL en tubos calibrados y se cuantificó por cromatografía gaseosa.

La cuantificación de HA y PAHs se realizó en un cromatógrafo de fase gaseosa Agilent 6890, equipado con columna capilar HP-05 y detector de ionización de llama (FID). Se usó 1-clorooctadecano como estándar interno “surrogate”. Los compuestos se cuantificaron mediante curvas de calibración.

Para las determinaciones de BTEX, se recogieron muestras de agua y sedimentos (10 mL y 10 g) en viales con septum (EPA 3810) y se mantuvieron a 70 °C. Se extrajeron 2 mL del espacio de cabeza con una jeringa y se analizaron por inyección directa en un cromatógrafo de fase gaseosa.

El límite de detección (LD) fue de 13 µg/L y 1000 µg/kg peso seco (ps) para TPHs; 5 µg/L y 25 µg/kg ps para BTEX; 1 µg/L y 23 µg/kg ps para los 16 PAHs.

4.4.2. Plaguicidas

4.4.2.1. Organoclorados y Piretroides

Las determinaciones de plaguicidas organoclorados (OC) y piretroides (Pir) en muestras de agua se realizaron mediante extracción líquido-líquido (EPA 3510C), con hexano como solvente. La identificación y cuantificación de los compuestos se realizó por cromatografía gaseosa y detector de captura de electrones (µECD) mediante estándar externo (curvas de calibración).

La extracción de OC y Pir en sedimentos se realizó junto con los hidrocarburos. Se reunieron las fracciones F1 y F2, se intercambió el solvente a hexano y a continuación se siguió el mismo esquema cromatográfico que el de las muestras de agua. Los compuestos detectados fueron confirmados por µECD cambiando la columna HP-05 por una HP-17. El LD fue 0,001 µg/L y 0,01 µg/kg ps para OC; y 0,01 µg/L y 70 µg/kg ps para Pir.

4.4.2.2. Organofosforados y Carbamatos

La extracción de plaguicidas organofosforados (OF) y carbamatos (Carb) en agua se realizó por fase sólida (SPE) (EPA 3535A con modificaciones), con cartucho de polímero de fase reversa (Strata™ Phenomenex). Luego del secado al aire y bajo corriente de nitrógeno, los cartuchos se eluyeron con hexano y cloruro de metileno. Los extractos se concentraron y se añadieron 250 µL de hexano. Los extractos se analizaron por cromatografía gaseosa con detector de nitrógeno-fósforo (CG-DNP). La identificación y

cuantificación de los compuestos se realizaron mediante curvas de calibración. La confirmación se realizó por cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas (CG-SM).

Las muestras de sedimentos (10 g) se colocaron dentro de columnas con tapa de polipropileno con filtros de papel. Se añadieron 8 mL de acetato de etilo a cada columna y se sonicaron en un baño ultrasónico (potencia = 150 W y frecuencia = 35kHz) durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, las columnas se colocaron en una cuba Lichrolut y los extractos se recogieron en tubos de 10 mL. Luego de recoger todo el líquido, se añadieron 8 mL de acetato de etilo y se repitió el procedimiento. Finalmente, se añadieron 2 mL de solvente a cada columna para enjuague final y se dejó eluir por completo. Los extractos se concentraron en corriente de nitrógeno hasta un volumen de 10 mL y se transfirieron a un vial. Finalmente, se inyectaron en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de nitrógeno y fósforo (CG-DNP).

El LD fue 0,02 µg/L y 7 µg/kg ps para OF; 0,03 µg/L y 10 µg/kg ps para Carb.

4.5. Disipación de los componentes de la WAF

El estudio de disipación de los componentes de la WAF se realizó en frascos de vidrio (1,5 L) a temperatura de 21°C ± 1 °C y fotoperiodo de 8:16 h (L:O). Las muestras de la WAF pura (1,2 L) se colocaron en frascos cerrados con tapa de polipropileno para evitar la pérdida de los compuestos más volátiles. El contenido de hidrocarburos presentes en cada muestra (una muestra = 1 frasco de vidrio) se analizó luego de 0, 6, 24, 48, 96 y 192 h. Las determinaciones de hidrocarburos se realizaron de acuerdo a la metodología descrita anteriormente (4.4.1.). El tiempo de vida media de hidrocarburos ($t_{1/2}$) se calculó mediante un programa de regresión no lineal (Venturino et al., 1992), utilizando una ecuación de decaimiento exponencial simple:

$$Y(t) = Y(0) e^{(-\ln 2 t/t_{1/2})}$$

Y(t): Concentración a tiempo t

Y(0): Concentración inicial

4.6. Bioensayos

Se evaluó la toxicidad aguda (96 h) y crónica (14 d) de WAF en anfípodos de la especie *H. curvispina* (4 mm; 5,3 mg). Grupos de diez individuos fueron expuestos a un rango de concentraciones de WAF en frascos de vidrio (1,5 L) (Tabla 4.1). La WAF se diluyó en agua de clorinada hasta un volumen final de 1 L. Los grupos control se mantuvieron en agua de clorinada sin WAF. Los ensayos se llevaron a cabo en condiciones semiestáticas, con recambio de la WAF a los 7 d. Los ensayos se replicaron cinco veces en días diferentes a una temperatura constante de 21 ± 1 ° C y fotoperíodo de 8:16 h (L:O). Durante los experimentos, los frascos se cubrieron con una tapa de polipropileno para minimizar la disipación. La supervivencia se controló diariamente, y los animales muertos se registraron y eliminaron. Los animales se observaron bajo el microscopio y se consideraron muertos aquellos que no mostraban movimiento de los pleópodos durante un período de observación de 20 s.

En la tabla 4.1 se indican los detalles de los bioensayos realizados con los anfípodos de ambas poblaciones.

Tabla 4.1: Bioensayos realizados con *H. curvispina* expuestos a WAF. Se detalla la población de la cual provienen los anfípodos, la duración de cada ensayo, el número total de organismos empleados en el ensayo, el número de tratamientos (sin incluir al control), el número de réplicas por tratamiento y el rango de concentraciones de WAF utilizadas.

Población	Duración del ensayo	N° organismos	N° Tratamientos	Réplicas/ Tratamiento	Rango de concentraciones (mg/L TPHs)
LB	96 h	300	6	5	0,011-0,35
	14 d	550	11	5	0,0007-0,70
AD	96 h	350	7	5	0,044-2,50
	14 d	300	6	5	0,088-2,50

Los datos de los bioensayos se analizaron mediante dos estudios complementarios: análisis Probit y modelo logístico. El análisis Probit se realizó utilizando el software PriProbit NM del Dr. Sakuma

(<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=11281>). Por otra parte, se realizaron ajustes de regresión no lineal usando un programa basado en el enfoque iterativo de diferencia de mínimos cuadrados (Venturino et al., 1992). El modelo logístico incluyó el porcentaje de supervivencia (% S) para la población en las condiciones de control, junto con la CL50 y la pendiente logística (m) según la ecuación:

$$\% \text{ mortalidad} = 100 - [\% S / (1 + (\text{concentración de TPHs} / \text{CL50})^m)]$$

El mejor ajuste del modelo a los datos se determinó mediante el criterio de Akaike. También se estimaron los valores de la concentración de efecto no observado (NOEC) y concentración mínima de efecto observado (LOEC), calculando la concentración letal 1 (CL1) y la concentración letal 10 (CL10) con sus límites de confianza, a partir de las ecuaciones ajustadas (Crane & Newman, 2000; Murado & Prieto, 2013).

En la figura 4.5 se esquematiza el diseño descrito para los bioensayos.

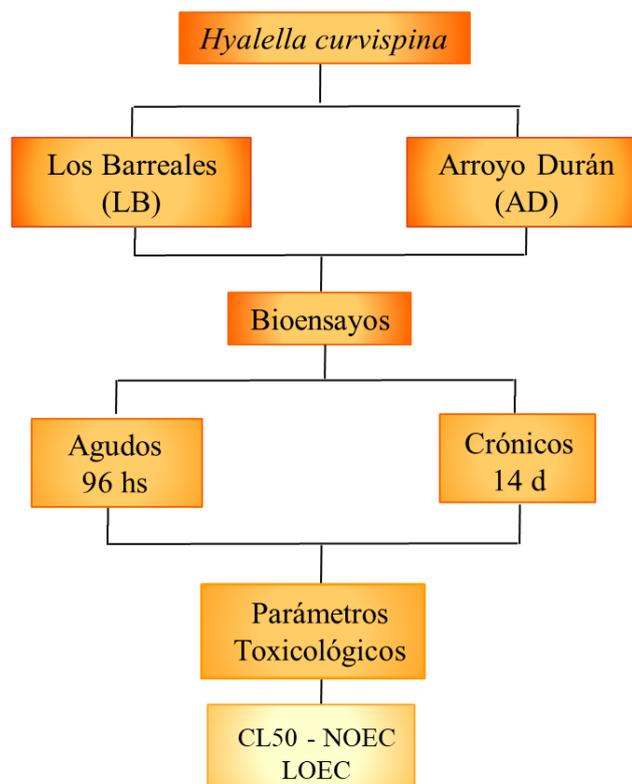


Figura 4.5: Esquema de los bioensayos realizados con la especie *H. curvispina* de LB y AD.

4.6.1. Exposición a concentraciones subletales de WAF

En los ensayos de toxicidad se utilizó WAF, la cual fue preparada inmediatamente antes de comenzar cada serie de ensayos. Los anfípodos de LB se expusieron a una concentración de WAF correspondiente a la CL1 previamente determinada en los bioensayos agudos (0,0014 mg/L). Como no se registró mortalidad de anfípodos recolectados en AD tanto en exposiciones agudas como en crónicas a WAF pura, se eligió una posible concentración ambiental estimada por la media geométrica entre la concentración de WAF pura y la concentración de TPHs encontrada en el agua (0,35 mg/L). A los correspondientes grupos controles se les agregó agua de clorinada sin WAF. Los tiempos de exposición fueron de 6, 24 y 48 h. Durante los períodos de exposición no se les renovó el medio ni se los alimentó. Las exposiciones se realizaron en frascos de vidrio manteniendo las mismas condiciones utilizadas en los bioensayos.

4.7. Estudios bioquímicos

En los estudios bioquímicos se utilizaron individuos de LB y AD controles y expuestos a las concentraciones subletales de WAF. Cada grupo de diez individuos (pool) fue almacenado en ultrafreezer, dentro de un tubo eppendorf.

4.7.1. Preparación de homogenados de *H. curvispina*

Para la determinación del contenido de GSH y actividades GST y CAT, grupos de diez anfípodos juveniles (por quintuplicado) fueron homogeneizados en 500 µL de buffer fosfato de potasio (143 mM), EDTA 6,3 mM; pH 7,5, con un homogeneizador PRO eléctrico 200. De cada homogenado se separaron alícuotas para cuantificar los contenidos de GSH y proteínas. El volumen restante de cada homogenado se centrifugó a 10.000 x g durante 30 min a 4 °C y los sobrenadantes se distribuyeron en alícuotas para la determinación de las actividades GST, CAT y contenido de proteínas. El contenido de GSH se cuantificó de inmediato, mientras que los homogenados para las determinaciones de las actividades enzimáticas y proteínas se congelaron a -80 °C hasta el momento de su determinación (Figura 4.6).

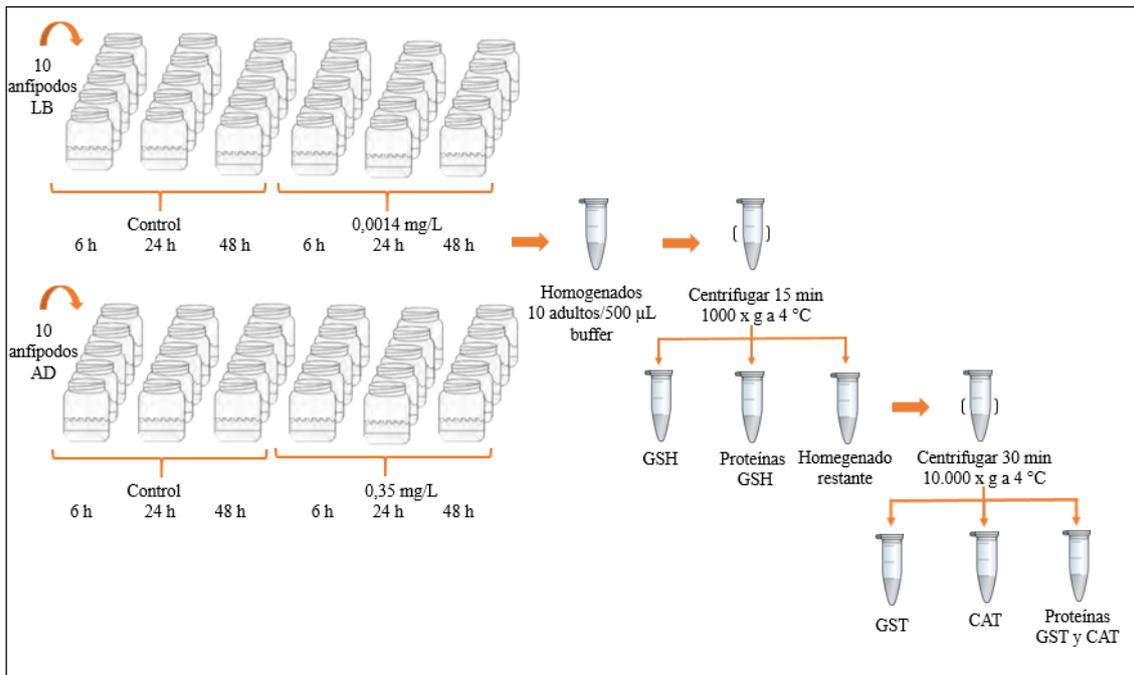


Figura 4.6: Esquema del diseño experimental para la determinación del contenido de GSH y actividades de GST y CAT

4.7.2. Contenido de glutatión reducido

El contenido de GSH se determinó mediante el método de Ellman (1959) modificado. El homogenado se mezcló 1:1 v/v con ácido tricloroacético (TCA) 10% y la mezcla se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min. El contenido de GSH fue medido inmediatamente como tioles ácido-solubles en 0,2 mL de sobrenadante, utilizando 1 mL de DTNB 1,5 mM en buffer fosfato de potasio 0,25 M pH 8,0. La mezcla fue incubada durante 20 min y se midió la absorbancia a 412 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603. Los tioles ácido-solubles fueron cuantificados utilizando una curva de calibración con GSH como estándar.

4.7.3. Actividad glutatión S-transferasa

La actividad GST se determinó por el método de Habig et al. (1974) modificado, utilizando CNDB como sustrato. La mezcla de reacción consistió en 0,93 mL buffer fosfato 100 mM pH 6,5, 10 µL CNDB 0,5 mM disuelto en acetonitrilo al 1% v/v y 50 µL GSH 2,5 mM. Luego de registrar la línea de base (reacción no enzimática), se adicionaron 10 µL de homogenado. Durante un min se registraron los cambios en la absorbancia a

340 nm. En todos los casos, cada determinación fue realizada por duplicado. La actividad fue expresada como $\mu\text{moles de CDNB conjugado}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, utilizando el coeficiente de extinción molar $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.7.4. Actividad catalasa

La actividad CAT fue determinada de acuerdo a la técnica de Beers & Sizer (1952). La reacción se realizó en 1 mL de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 que contenía 25 mM de H_2O_2 como sustrato. La absorbancia de la mezcla de reacción fue controlada a 240 nm para asegurar un valor inicial del sustrato igual a 1 unidad de absorbancia, ya que la CAT presenta control difusional de su actividad y es imposible su saturación con sustrato. Para iniciar la reacción se agregaron 40 μL de sobrenadante a la mezcla de reacción y se registró la caída de absorbancia en forma continua exclusivamente en el tramo lineal inicial. Los datos obtenidos fueron transformados a $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, utilizando un coeficiente de extinción molar de $40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.7.5. Actividad citocromo P450

La actividad CYP450 se determinó por fluorimetría directa utilizando 7-etoxicumarina (7-EC) como sustrato (Bouvier et al., 2002). El ensayo se basa en la O-dealquilación de la 7-EC para producir 7-hidroxycumarina (7-OHC) fluorescente (ECOD). Los anfípodos, luego de su exposición a WAF, fueron cortados en tres partes y colocados individualmente en un pocillo de una microplaca negra (96 pocillos) con 50 μL de buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,2. La reacción se inició con el agregado de 50 μL de la solución de desarrollo (7-EC 20 mM en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,2). Luego de 4 h de incubación a 30 °C, se detuvo la reacción con el agregado de 100 μL de la solución de frenado (glicina 0,1 mM y etanol en relación 1:1, pH 10,4). Los blancos de reacción contenían al organismo sólo con la solución de frenado. Antes de cada medición, las placas fueron centrifugadas durante 1 min a 1.500 x g para descender el material biológico. La fluorescencia de las muestras se midió a 380 nm de excitación y 460 nm de emisión en un fluorómetro (Hitachi F-7000 Fluorescence Spectrophotometer). La actividad fue expresada como pg de 7-OHC/adulto x min, utilizando una curva estándar de 7-OHC (0,0125-1 nmol) como referencia en cada placa de medición.

4.7.6. Caracterización cualitativa de esterasas. Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida

Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) no desnaturizantes para caracterizar, en forma cualitativa, las diferentes isoformas de las EST de *H. curvispina*. Los homogenados se realizaron con anfípodos recién colectados de ambos sitios.

La separación electroforética de las proteínas se realizó de acuerdo con la técnica de Davis (1964), utilizando un equipo Mini PROTEAN®. La composición del gel de separación al 7% fue de 2,3 mL de acrilamida/bisacrilamida al 3% p/v, 2,5 mL de Tris HCl 1,5 M pH 8,8, 200 µL de persulfato de amonio al 10% y 5 µL de tetrametiletiléndiamina (TEMED). La composición del gel de concentración al 4% fue de 0,65 mL de acril/bisacrilamida al 3% p/v, 1,25 mL de buffer de muestra Tris HCl 0,5 M, pH 6,8, 5 µL de persulfato de amonio al 10% y 5 µL de TEMED. En un tubo eppendorf, se preparó cada muestra con un volumen suficiente de homogenado para una concentración final de 60 µg de proteína, e igual volumen del buffer de muestra Tris HCl 0,5 M, glicerol y de azul de bromofenol al 1% pH 6,8. En cada calle del gel se sembraron 20 µL de muestra, previa colocación del buffer de electrodos (buffer Tris HCl 0,025 M y glicina 192 mM pH 8,8). Se aplicó una corriente de 75 V durante 15 min para permitir el ingreso en el gel de separación y luego se aplicaron 150 V durante 60 min. A continuación, los geles fueron incubados por unos min con 100 mL de buffer de fosfato de sodio 0,05 M, con 0,5 g de Fast Garnet GBC y α- y β-naftil acetato 2% en acetona. Luego se descartó la solución de sustratos y colorante, se lavó cada gel dos veces con agua corriente y se lo conservó en ácido acético al 70%.

4.7.7. Determinación de la concentración de proteínas

El contenido de proteínas de las muestras se determinó mediante la técnica de Lowry et al. (1951). Se tomaron 10 µL de la muestra y se agregó NaOH 0,1 N hasta alcanzar un volumen final de 200 µL. Se agregó a cada tubo 1 mL de solución Na₂CO₃ 2% en NaOH 0,1 N con CuSO₄ 0,5% y tartrato de sodio y potasio 1%. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y luego se añadió 0,1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Luego de 20 min se registró la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro. Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) para realizar la curva estándar.

4.8. Estudios moleculares

En los estudios moleculares, se utilizaron anfípodos controles y expuestos durante 24 h a 0,0014 mg/L de WAF, provenientes del sitio LB. Cada grupo de cinco individuos fue almacenado en ultrafreezer, dentro de un tubo eppendorf.

4.8.1. Análisis de la expresión de ARN por reacción en cadena de la polimerasa

4.8.1.1. Extracción de ARN

Las muestras, conformadas por 5 anfípodos cada una, se homogeneizaron en 1 mL de Quick-Zol sobre hielo. Luego, se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos núcleo-proteicos. Se añadieron 0,2 mL de cloroformo y se agitaron los tubos durante 15 s en forma manual. Nuevamente, las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 15 min y se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 min a 4°C. Luego, se tomó la fase superior (donde se encontraba el ARN) y se transfirió a un nuevo tubo. El ARN de la fase acuosa se precipitó con 0,5 mL de alcohol isopropílico (isopropanol). Las muestras se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12.000 x g durante 8 min a 4 °C, obteniéndose un precipitado gelatinoso y blancuzco correspondiente al ARN. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet de ARN con 1 mL de etanol 75%. Las muestras se agitaron en vórtex y nuevamente fueron centrifugadas a 12.000 x g durante 8 min a 4 °C. Se descartó el etanol por inversión y los pellets se secaron brevemente al aire por 5 min. Por último, se disolvieron las muestras de ARN en 40 µL de solución fisiológica.

Para determinar la pureza del ARN extraído, se realizó una dilución de 5 µL de ARN en 495 µL de agua destilada y se leyó la absorbancia a 260 nm y 280 nm en el espectrofotómetro. La relación 260/280 debe variar entre 1,6 y 2 para que pueda considerarse que el ARN extraído tiene suficiente pureza. La concentración de ARN se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{ARN}] (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = (\text{Abs } 260 \times 40 \times 100)/1000$$

Las muestras de ARN fueron conservadas a -80 °C hasta su utilización.

4.8.1.2. Verificación de la integridad del ARN extraído

En un tubo se colocaron 4 μL de ARN y 1 μL de buffer de carga 6X por muestra. Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (Tris HCl 13,3 mM pH 7,6, 6,67 mM ácido acético glacial, 0,33 mM EDTA) con 2 μL de Gel Red. Las muestras fueron sembradas y sometidas a electroforesis en una cuba horizontal (multiSub Horizontal Gel System, Cleaver Scientific), utilizando buffer TAE 1X como buffer de corrida. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 90 V hasta que el frente de corrida alcanzó el final del gel. La visualización se llevó a cabo en un transiluminador UV (MaestroGen® Slider Imager). El ARN se consideró íntegro al visualizarse dos bandas correspondientes a los ARN ribosomales 18S y 28S.

4.8.1.3. Retrotranscripción

Una vez verificada la integridad del ARN extraído, se procedió a su transformación en ADN copia (ADNc) por reacción de retrotranscripción. En un tubo de reacción libre de nucleasas, se colocaron 2 μg de ARN, 2 μL de oligo dT 10 μM y agua dietilpirocarbonato (DEPC) para completar un volumen final de 12,5 μL . Los tubos se calentaron a 65 °C durante 5 min para permitir la relajación de las estructuras secundarias del ARN, y transcurrido este tiempo, se colocaron inmediatamente en hielo. Luego se añadió 4 μL del buffer de reacción 5X (M-MLV RT), 0,2 μL de M-MLV Retrotranscriptasa (200 U/ μL), 2 μL de DTT 100 mM, 1 μL de dNTPs 25 mM y 0,3 μL de agua DEPC. Se mezclaron suavemente los tubos, se incubaron a 42 °C durante 1 h y luego, a 70 °C durante 10 min. Las muestras de ADNc se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

4.8.1.4. Cebadores

La amplificación de un fragmento de alrededor de 710 pb del gen CYP de los anfípodos de LB se realizó utilizando los cebadores diseñados por Folmer et al. (1994):

Cebador Sentido, LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'

Cebador Antisentido, HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'

4.8.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se rotularon tubos estériles para PCR y en cada uno de ellos se añadió 2 µL de buffer 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 0,2 µL de dNTPs 25 mM, 1 µL MgCl₂ 50 mM, 0,5 µL de cebador sentido (forward) 10 µM, 0,5 µL de cebador antisentido (reverse) 10 µM, 0,2 µL de TaqPolimerasa 5 U/µL, 12,6 µL de agua DEPC y 3 µL de ADNc, totalizando un volumen final de reacción de 20 µL. Los tubos fueron colocados en un termociclador (Biometra® Personal Cycler) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C, 3 min; 40 ciclos de 95 °C, 1 min; 45 °C, 1 min; 72 °C, 1,30 min; elongación final a 72 °C, 7 min; refrigeración a 4 °C.

Para evaluar la amplificación lograda en la PCR se preparó un gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X con 2 µL de Gel Red. En cada tubo se colocaron 10 µL de ADNc y 2 µL de buffer de carga 6X. Las muestras y el marcador de peso molecular fueron sembradas y sometidas a electroforesis en una cuba horizontal (multiSub Horizontal Gel System, Cleaver Scientific), utilizando buffer TAE 1X como buffer de corrida. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 90 V hasta que el frente de corrida alcanzó el final del gel. La visualización se llevó a cabo en un transiluminador UV (MaestroGen® Slider Imager).

4.9. Distribución de sensibilidad de especies

Los efectos de la WAF en organismos de agua dulce se caracterizaron mediante una curva de distribución de sensibilidad de las especies (SSD) (ECOFRAM, 1999). Los datos de toxicidad aguda de WAF (96 h-CL₅₀) correspondientes a diferentes especies de crustáceos y peces se obtuvieron de la base de datos ECOTOX y de los resultados del presente trabajo. Sólo se incluyeron los datos bibliográficos que cumplieran los siguientes criterios: valores de toxicidad aguda (CL₅₀) informados como TPHs o equivalente, 48-96 h de exposición continua a WAF, desarrollado en agua dulce, utilizando como etapas de vida: larva, juvenil o adulto (no embriones). Cuando se informaron más de un dato toxicológico para una especie, se utilizó el valor medio geométrico como estimación para dicha especie. Los parámetros físico-químicos (como por ejemplo temperatura, oxígeno, etc.) también fueron controlados durante el experimento (Wheeler et al., 2002). Para desarrollar la curva SSD, las especies se clasificaron por orden de sensibilidad decreciente y el rango de cada especie se transformó en un valor percentil ($i/(n + 1)$), donde i es el

rango de la especie y n el número total de especies utilizadas (ECOFRAM, 1999). Se ajustó un modelo de regresión lineal del porcentaje de especies en función de los valores de CL50 transformados a logaritmo. La concentración de WAF que afectaría al 10% de las especies se estimó a partir de la regresión.

4.10. Análisis estadísticos

Los resultados de las determinaciones enzimáticas se analizaron mediante el programa Statistica (StatSoft. Inc., versión 7) a través de un análisis de la varianza (ANOVA) factorial. Las comparaciones de medias se realizaron mediante el test de Tukey, con un nivel de significancia de 5% ($p < 0,05$). Los datos que no cumplieron con la condición de normalidad y/u homogeneidad de la varianza fueron transformados. Los valores de las actividades enzimáticas de CYP450 correspondientes a la población LB y de GST correspondientes a AD se transformaron a logaritmo previo a los análisis.

Para analizar el grado de asociación entre dos o más variables, se realizó un análisis de correlación. Luego, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) en ambas poblaciones de anfípodos para determinar la contribución de la respuesta de cada biomarcador a la exposición de WAF. Para el análisis, se tomaron las muestras como casos y las diferentes actividades enzimáticas como variables. La hoja de datos de ACP constó de los valores originales de las actividades enzimáticas GSH, GST, CAT y CYP450 basales y resultantes de la exposición a WAF durante 6, 24 y 48 h de cada población.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Análisis de la composición y disipación de la WAF en el tiempo

La concentración total de hidrocarburos en la WAF fue de 2,50 mg/L (Tabla 5.1). Los principales componentes de esta fracción fueron C9-C36 n-alcanos (TPHs), que comprendieron aproximadamente el 90% de la masa de hidrocarburos (2,18 mg/L). También se encontraron en menor proporción hidrocarburos aromáticos conformados por un solo anillo (BTEX) y bajas concentraciones de PAHs, particularmente naftaleno. Dentro del grupo BTEX, la concentración de benceno (0,025 mg/L), etilbenceno (0,021 mg/L), m- p- xileno (0,029 mg/L) y o-xileno (0,018 mg/L) fue similar. Sin embargo, la concentración de tolueno fue 10 veces mayor que la de los otros componentes.

Tabla 5.1: Composición de WAF.

Grupo de hidrocarburos	Compuesto	Concentración (mg/L)
TPHs	C9-C36	2,18
BTEX	Benceno	0,025
	Tolueno	0,24
	Etilbenceno	0,021
	m- p- Xileno	0,029
	o-Xileno	0,018
PAHs	Naftaleno	0,022

Se ajustaron modelos exponenciales simples a los datos de disipación de cada componente de la WAF (Figura 5.1). La mayoría de las concentraciones iniciales estimadas de cada uno de los componentes de la WAF fueron similares a los valores determinados (Tabla 5.2). Sin embargo, el valor estimado de TPHs por el modelo exponencial fue levemente menor que su valor medido ($1,79 \pm 0,24$ mg/L vs. 2,18 mg/L en WAF). El $t_{1/2}$ estimado de disipación de los TPHs fue de 71 ± 32 h. Los $t_{1/2}$ estimados

para tolueno (65 ± 11 h), benceno (76 ± 16 h) y etilbenceno (88 ± 19 h) fueron estadísticamente similares entre sí y respecto a TPHs. Por otro lado, m- y p-xileno mostraron un $t_{1/2}$ superior (128 ± 25 h) que el de tolueno y benceno. Finalmente, el o-xileno mostró el $t_{1/2}$ más alto (217 ± 45 h), y fue significativamente diferente de los otros componentes. Particularmente, el $t_{1/2}$ de naftaleno no se pudo estimar porque en las primeras 6 h su concentración estaba por debajo de los límites de detección.

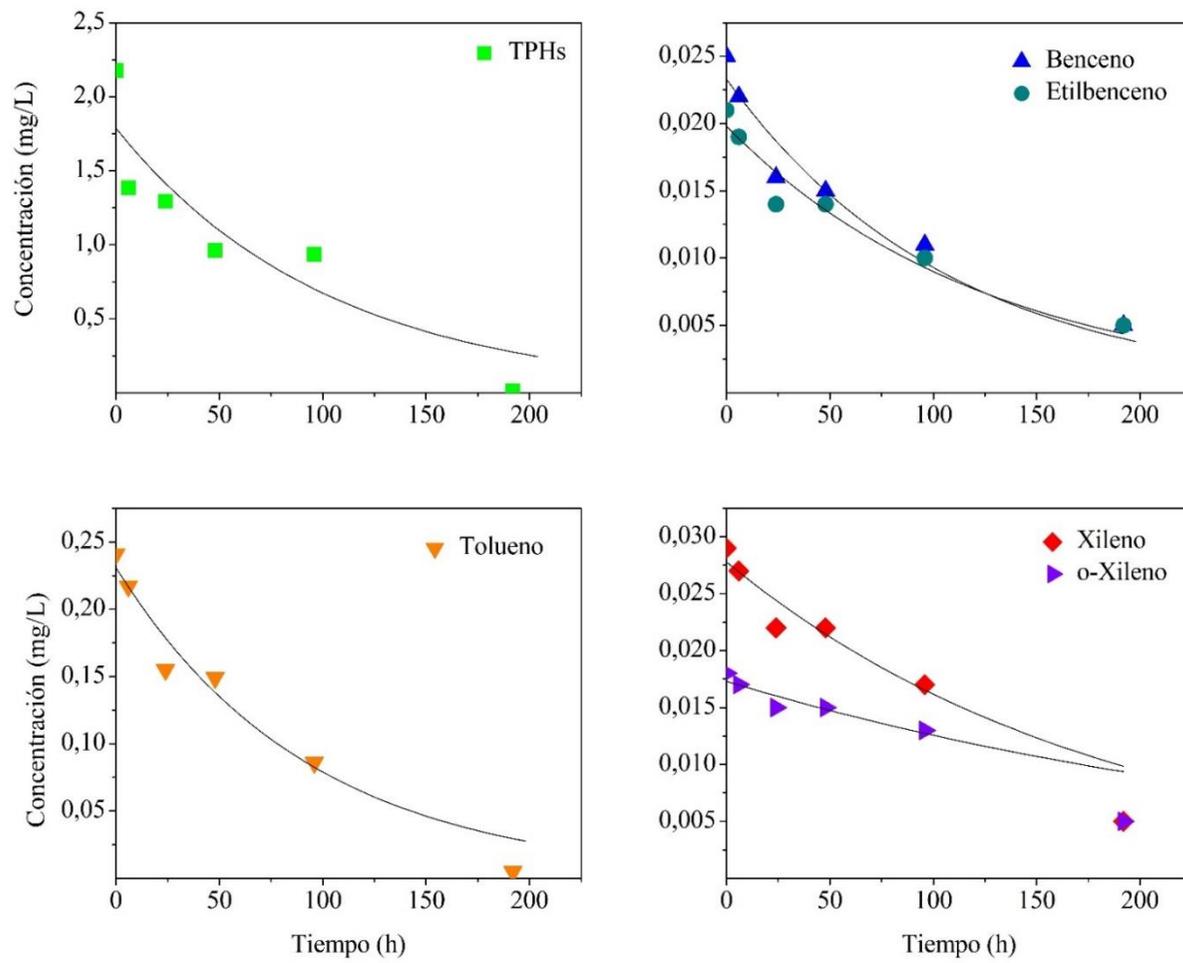


Figura 5.1: Disipación de los componentes de la WAF en el tiempo. Los puntos indican las concentraciones medidas y las líneas, la ecuación ajustada.

Tabla 5.2: Parámetros de disipación de los componentes de la WAF estimados a partir de un modelo exponencial simple.

Compuesto	Concentración inicial (t = 0)	Tiempo de vida media (t $\frac{1}{2}$)
	Media \pm EE (mg/L)	Media \pm EE (h)
TPHs	1,79 \pm 0,24	71 \pm 32 $\dagger\dagger$
Benceno	0,023 \pm 0,0014	76 \pm 16 * $\dagger\dagger$
Tolueno	0,23 \pm 0,012	65 \pm 11 * $\dagger\dagger$
Etilbenceno	0,020 \pm 0,0011	88 \pm 19 $\dagger\dagger$
m- p- Xileno	0,028 \pm 0,0011	128 \pm 25 \dagger
o-Xileno	0,017 \pm 0,00050	217 \pm 45 *

Las diferencias significativas vs. t $\frac{1}{2}$ xileno se indicaron con * p<0,05; vs. t $\frac{1}{2}$ o-xileno \dagger p<0,05, $\dagger\dagger$ p<0,01.

5.2. Caracterización físico-química de los sitios de muestreo

Los parámetros físico-químicos correspondientes a muestras de LB y AD se muestran en la tabla 5.3.

Tabla 5.3: Parámetros físico-químicos de los sitios de muestreo.

Sitio	pH	Temperatura	Conductividad	Oxígeno
		(°C)	Eléctrica (μ S/cm)	Disuelto (mg/L)
LB	8,15	19,90	182,72	7,40
AD	7,47	20,00	1250,00	5,20

Fecha de muestreo: 10/02/2016

Los sitios corresponden a ambientes que difieren en cuanto a sus características ecológicas. En LB, la temperatura fue de 19,90°C y el pH netamente alcalino como ya

fue registrado por Monza et al. (2013). El valor de la conductividad eléctrica fue de 182,72 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y el de oxígeno disuelto de 7,40 mg/L. El arroyo Durán presentó un valor de temperatura de 20,00 °C y el pH fue levemente alcalino. El valor de la conductividad eléctrica fue de 1250,00 $\mu\text{S}/\text{cm}$, aproximadamente 7 veces mayor que en LB, y el de oxígeno disuelto de 5,20 mg/L.

La muestra de sedimentos de LB consistió en 1,60% de arcilla, 10,80% de arena y 87,60% de grava. El contenido promedio de materia orgánica fue de 1,66%. La muestra de sedimentos de AD mostró una composición granulométrica diferente, donde el porcentaje de arcilla fue de 25,00, arena de 19,60, grava de 55,40 y materia orgánica de 10,20. El elevado porcentaje de materia orgánica en AD puede atribuirse a que las márgenes del arroyo presentan una densa vegetación ribereña, la cual genera aportes orgánicos tanto vía aérea como radicular.

La concentración de hidrocarburos hallada en los sedimentos de LB fue de 32,74 mg/kg ps. Su análisis cromatográfico mostró un predominio de alcanos de cadena impar y alto peso molecular, mientras que las concentraciones de BTEX y PAHs estuvieron por debajo de los niveles de detección. En la muestra de agua de LB no se detectaron hidrocarburos. En el sitio AD, las concentraciones de hidrocarburos fueron de 0,028 mg/L en agua y 900,07 mg/kg ps en sedimentos. Ambas muestras mostraron un predominio de hidrocarburos de alto peso molecular de cadena impar (n-C25 a n-C35) (Figura 5.2). La concentración de hidrocarburos en sedimentos de AD fue 27 veces mayor que la de LB, lo que demuestra que el área estaba muy contaminada con n-alcanos. No se detectaron BTEX y PAHs como tampoco plaguicidas OC, Pir, OF y Carb en muestras de agua y sedimento provenientes de AD.

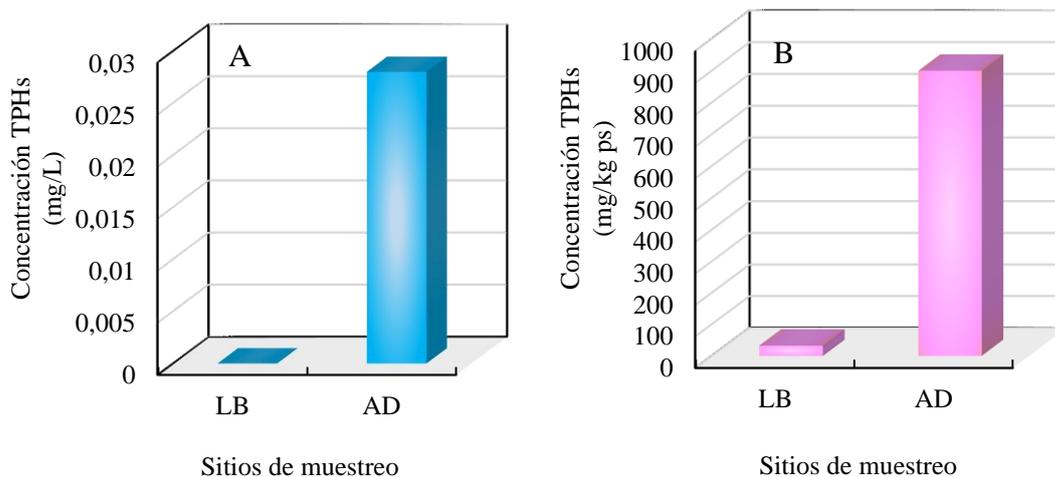


Figura 5.2: Concentración de TPHs en muestras de agua (A) y sedimento (B) correspondientes a los sitios de muestreo LB y AD.

5.3. Bioensayos

Se evaluó la toxicidad aguda (96 h) y crónica (14 d) de WAF en anfípodos de la especie *H. curvispina* provenientes de LB y AD.

Los parámetros estadísticos de los bioensayos estimados a través de análisis Probit (Figura 5.3) y del modelo logístico (Figura 5.4) se resumen en la tabla 5.4. Ambos análisis presentaron valores similares de CL50, LOEC y pendiente.

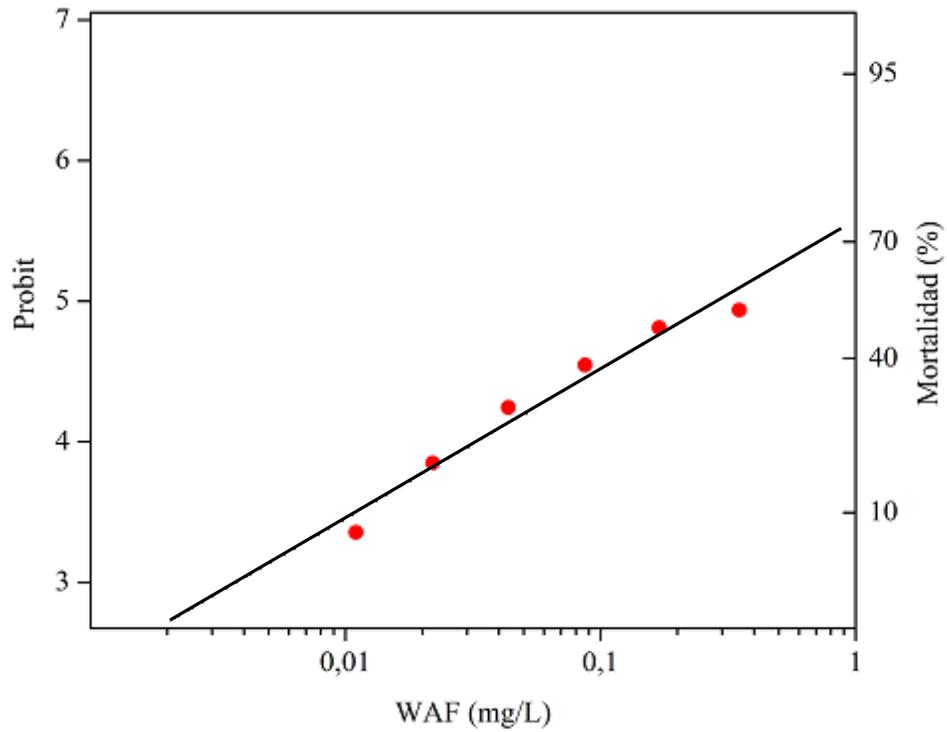
La toxicidad aguda y crónica a WAF en anfípodos de LB fue de 0,33 mg/L y 0,018 mg/L, respectivamente. Por otro lado, no se registró mortalidad de anfípodos recolectados en AD tanto en exposiciones agudas como en crónicas a WAF.

Los bajos valores de pendientes en los bioensayos fueron indicativos de una alta heterogeneidad de respuesta a WAF en la población de LB. La supervivencia del control fue del 100% y 84,4% en los ensayos agudo y crónico, respectivamente.

Tabla 5.4: Toxicidad aguda y crónica de WAF en anfípodos de *H. curvispina* de LB.

Ensayo	Análisis	CL50 (95% IC) (mg/L)	NOEC (95% IC) (x 10 ⁻³ , mg/L)	LOEC (95% IC) (x 10 ⁻³ , mg/L)	Pendiente ± EE
Agudo	Probit	0,31 (0,18-0,49)	1,24 (0,099-4,06)	14,00 (4,80-27,00)	1,05 ± 0,10
	Logístico	0,33 (0,24-0,41)	0,43 (0,071-1,52)	14,00 (4,90-28,00)	0,69 ± 0,13
Crónico	Probit	0,017 (0,0060-0,036)	0,0059 (0,00022-0,043)	0,20 (0,013-0,90)	0,66 ± 0,09
	Logístico	0,018 (0,015-0,021)	0,00081 (0,000092-0,0040)	0,15 (0,048-0,35)	0,46 ± 0,08

A



B

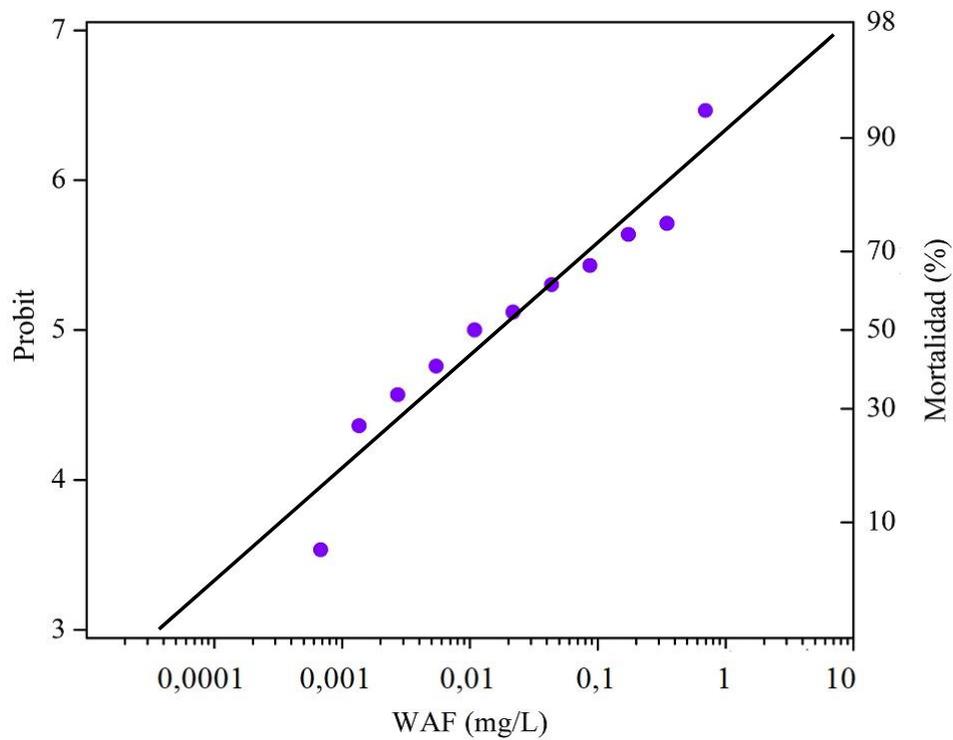


Figura 5.3: Toxicidad aguda (A) y crónica (B) de WAF en anfípodos de *H. curvispina* del sitio LB. Análisis Probit.

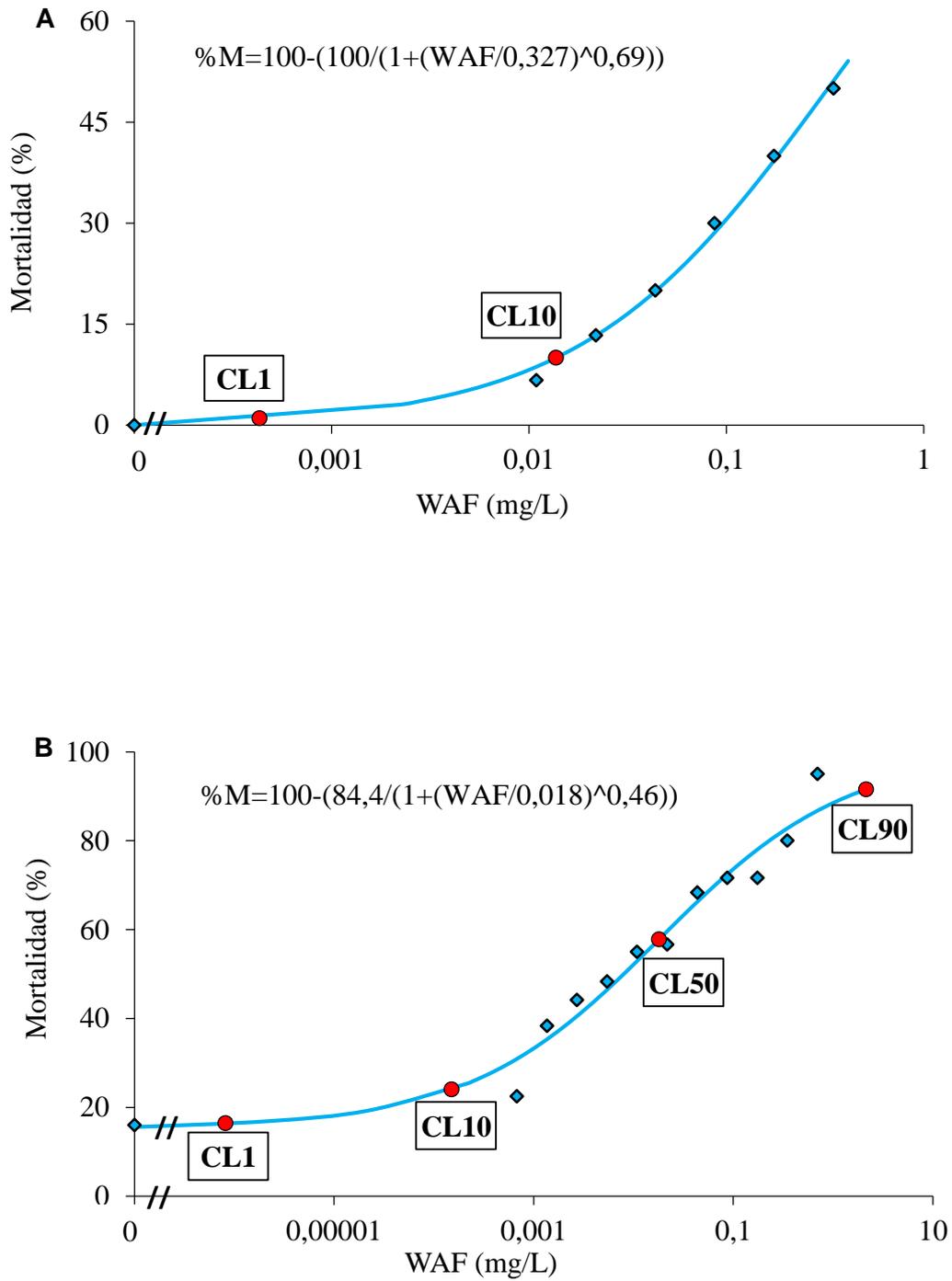


Figura 5.4: Toxicidad aguda (A) y crónica (B) de WAF en anfípodos de *H. curvispina* del sitio LB. Modelo Logístico.

5.4. Estudios bioquímicos

5.4.1. Contenido de glutatión reducido

El contenido de GSH en individuos controles y expuestos a una concentración subletal de WAF se muestran en la figura 5.5. El contenido de GSH promedio del grupo control de LB ($5,16 \pm 0,44$ nmoles/mg de proteína) y AD ($0,89 \pm 0,094$ nmoles/mg de proteína) presentaron diferencias altamente significativas ($p=0,000000$). El contenido basal de GSH en anfípodos de AD fue 82,66% menor que el de LB. En la población LB, el contenido de GSH aumentó en forma significativa a su respectivo control en todos los tiempos de exposición a WAF evaluados ($p=0,000002$). En la población AD, el contenido de GSH sólo aumentó en forma significativa en las primeras 6 h de exposición a WAF (153,09%, $p=0,00056$).

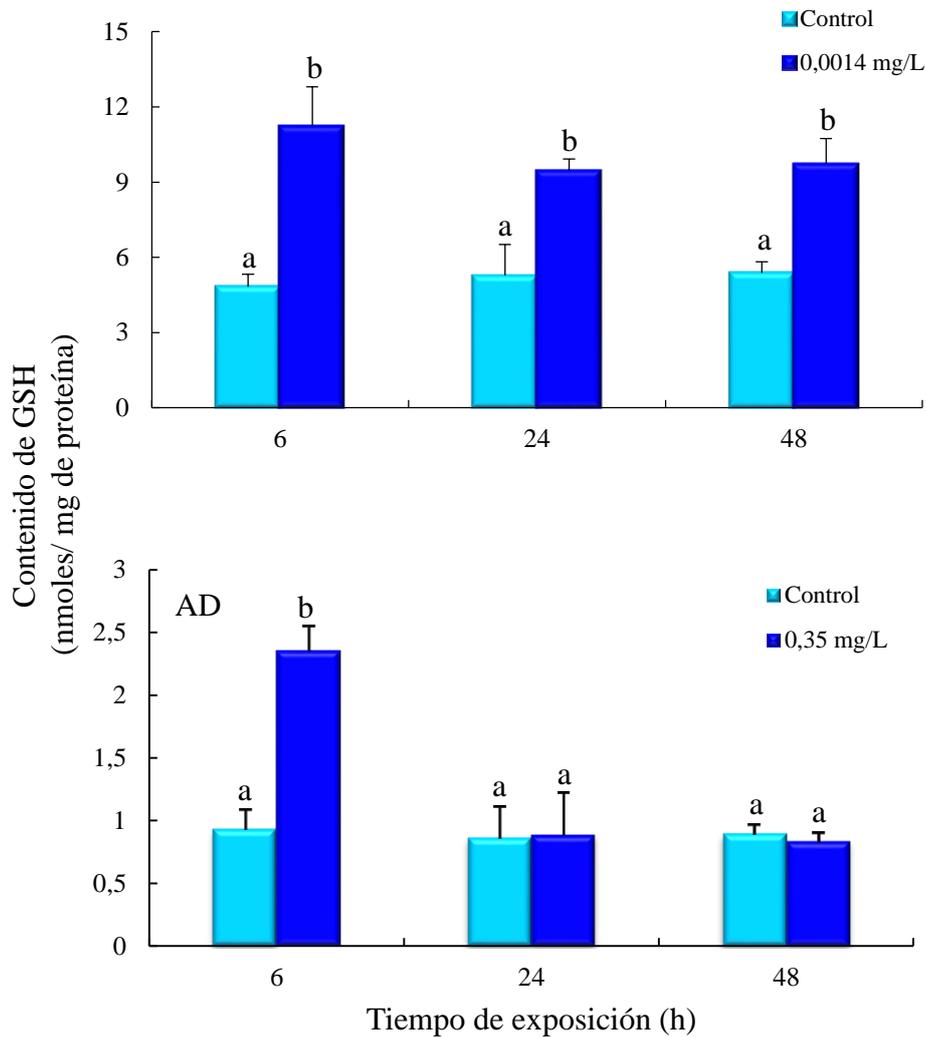


Figura 5.5: Contenido de GSH endógeno en anfípodos de *H. curvispina* de LB y AD expuestos a WAF durante diferentes tiempos. Las barras representan el contenido promedio de cinco réplicas independientes. Las líneas verticales representan los EE. Las diferencias dentro de cada población fueron analizadas por ANOVA factorial seguido de la prueba de comparación de medias de Tukey. En cada población, letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

5.4.2. Actividad glutatión S-transferasa

La actividad GST en individuos controles y expuestos a una concentración subletal de WAF se muestran en la figura 5.6. La actividad GST promedio en el grupo control de LB ($0,30 \pm 0,0066$ μ moles/min/mg de proteína) y AD ($0,25 \pm 0,0057$ μ moles/mg de proteína) presentaron diferencias significativas ($p=0,000004$). La actividad GST en anfípodos de AD fue del 16,81% menor que la determinada para LB. La exposición de LB a WAF durante 6 h, no produjo diferencias significativas en la actividad GST respecto a su control ($p=0,97$). Sin embargo, la actividad de esta enzima disminuyó un 4,1% y 30,52% luego de 24 y 48 h de exposición, respectivamente ($p=0,037$; $p=0,00041$). En la población AD, la actividad GST no mostró diferencias significativas con respecto a su control en ninguno de los tres tiempos de exposición ($p=0,99$; $p=0,73$; $p=0,14$).

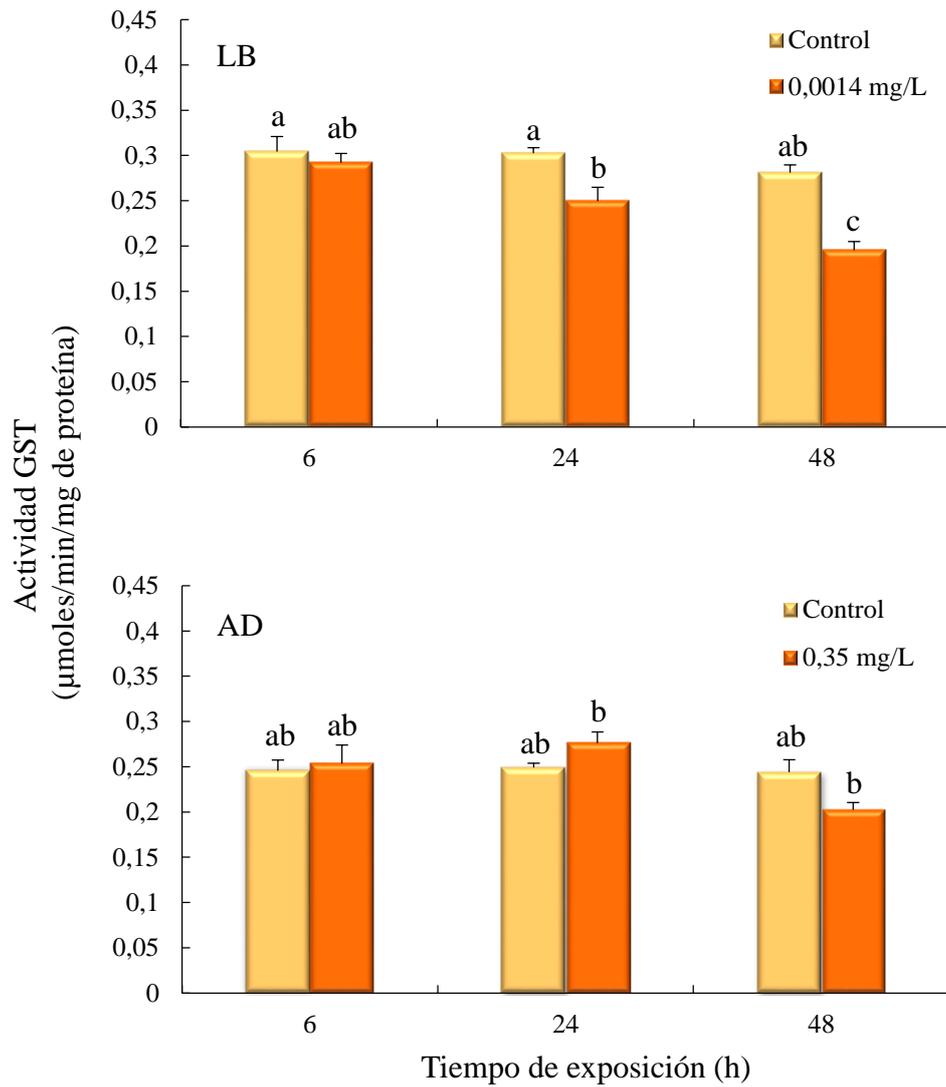


Figura 5.6: Actividad GST en anfípodos de *H. curvispina* de LB y AD expuestos a WAF durante diferentes tiempos. Las barras representan la actividad GST promedio de cinco réplicas independientes. Las líneas verticales representan los EE. Las diferencias dentro de cada población fueron analizadas por ANOVA factorial seguido de la prueba de comparación de medias de Tukey. En cada población, letras distintas indican diferencias significativas.

5.4.3. Actividad catalasa

La actividad CAT en individuos controles y expuestos a una concentración subletal de WAF se muestran en la figura 5.7. La actividad CAT promedio en el grupo control de LB ($1,18 \pm 0,064$ $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) y AD ($4,11 \pm 0,44$ $\mu\text{moles}/\text{mg}$ de proteína) presentó diferencias altamente significativas ($p=0,000000$). La actividad CAT en anfípodos de AD fue 345,73% mayor con respecto a la de LB. En la población LB, la actividad de CAT aumentó en forma creciente respecto a su control independientemente de los tiempos de exposición ($p=0,010$). Por el contrario, la actividad CAT en la población AD disminuyó en forma significativa a las 24 de exposición ($p=0,0021$).

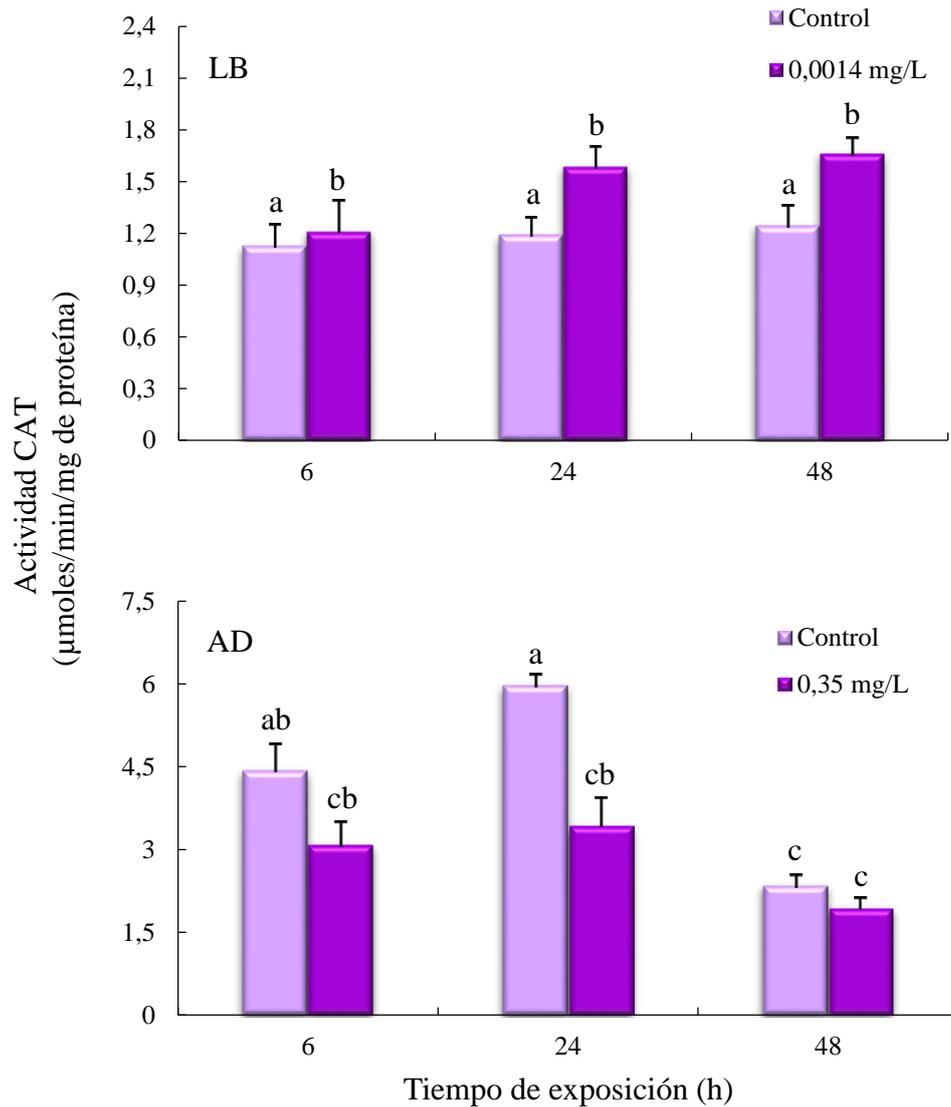


Figura 5.7: Actividad CAT en anfípodos de *H. curvispina* de LB y AD expuestos a WAF durante diferentes tiempos. Las barras representan la actividad CAT promedio de cinco réplicas independientes. Las líneas verticales representan los EE. Las diferencias dentro de cada población fueron analizadas por ANOVA factorial seguido de la prueba de comparación de medias de Tukey. En cada población, letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

5.4.4. Actividad citocromo P450

La actividad CYP450 en individuos controles y expuestos a una concentración subletal de WAF se muestran en la figura 5.8. La actividad CYP450 promedio en el grupo control de LB ($12,58 \pm 0,54$ pg 7-OHC/min x adulto) y AD ($37,58 \pm 1,36$ pg 7-OHC/min x adulto) presentó diferencias altamente significativas ($p=0,000000$). La actividad CYP450 en anfípodos de AD fue 298,73% mayor con respecto a la de LB.

La actividad de CYP450 en anfípodos de LB aumentó en forma significativa, respecto a su control, e independiente de los tiempos de exposición entre 48% y 78% ($p=0,000000$). Sin embargo, la exposición a WAF en organismos de AD no modificó en forma significativa la actividad CYP450 para ninguno de los tres tiempos de exposición ($p=0,16$).

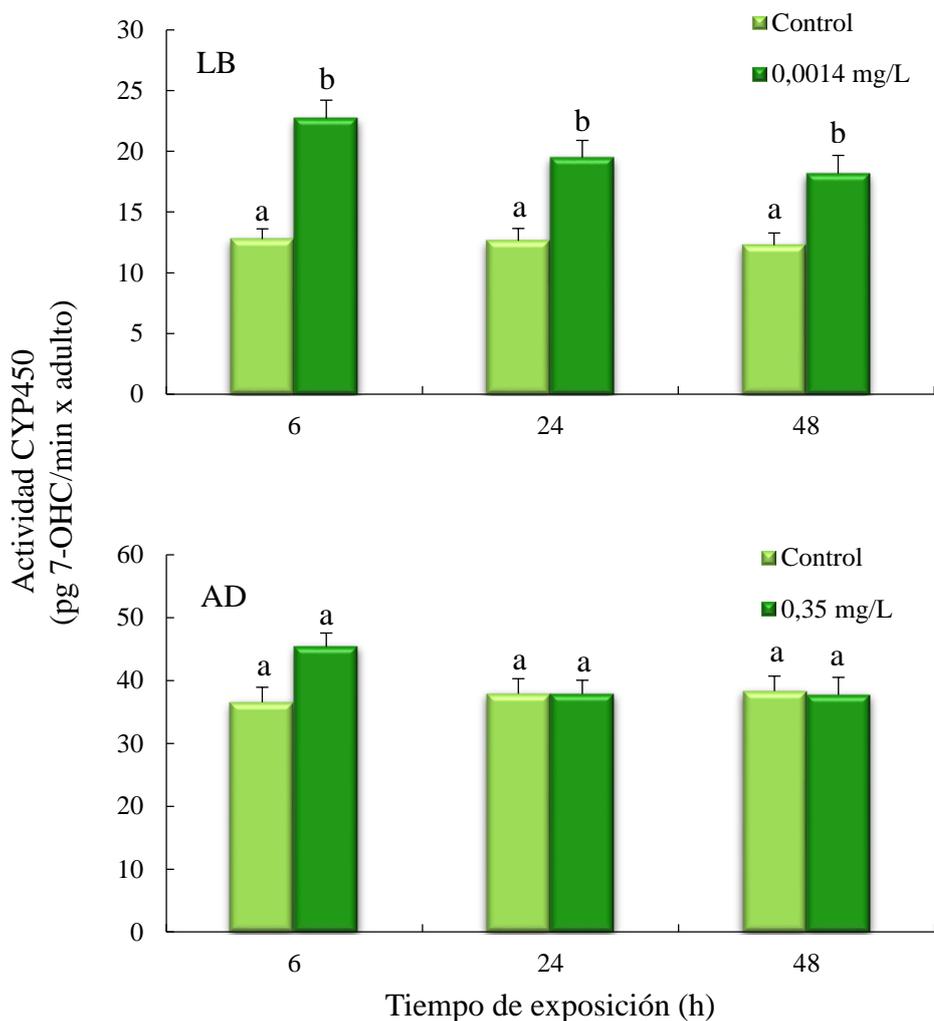


Figura 5.8: Actividad CYP450 en anfípodos de *H. curvispina* de LB y AD expuestos a WAF durante diferentes tiempos. Las barras representan la actividad CYP450 promedio de cinco réplicas independientes. Las líneas verticales representan los EE. Las diferencias dentro de cada población fueron analizadas por ANOVA factorial seguido de la prueba de comparación de medias de Tukey. En cada población, letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La figura 5.9 muestra las distribuciones de frecuencias de la actividad CYP450 en las poblaciones LB y AD. La población control LB presentó una distribución mesocúrtica, es decir, los valores presentan un grado de concentración medio (normal) en torno a su valor central o media. A las 6 h de exposición a WAF, se observó un desplazamiento

hacia valores más altos de actividad, donde un 57,14% de los individuos presentaron actividades superiores a la máxima determinada en los controles.

A las 24 y 48 h de exposición, un 35,71 y 42,86% de los individuos superaron a la mayor actividad determinada en controles, respectivamente.

Por otro lado, se observó que el 100% de los valores de la actividad CYP450 de la población control AD fueron mayores al IC95% superior de la media de LB (12,77 pg 7-OHC/min x adulto), que corresponden a actividades 3 veces más elevadas que la población control LB. Si bien a las 24 y 48 h de exposición a WAF, unos pocos individuos de la población AD presentaron actividades mayores a la máxima determinada para controles, a las 6 h, el 9,37% de los individuos la superó.

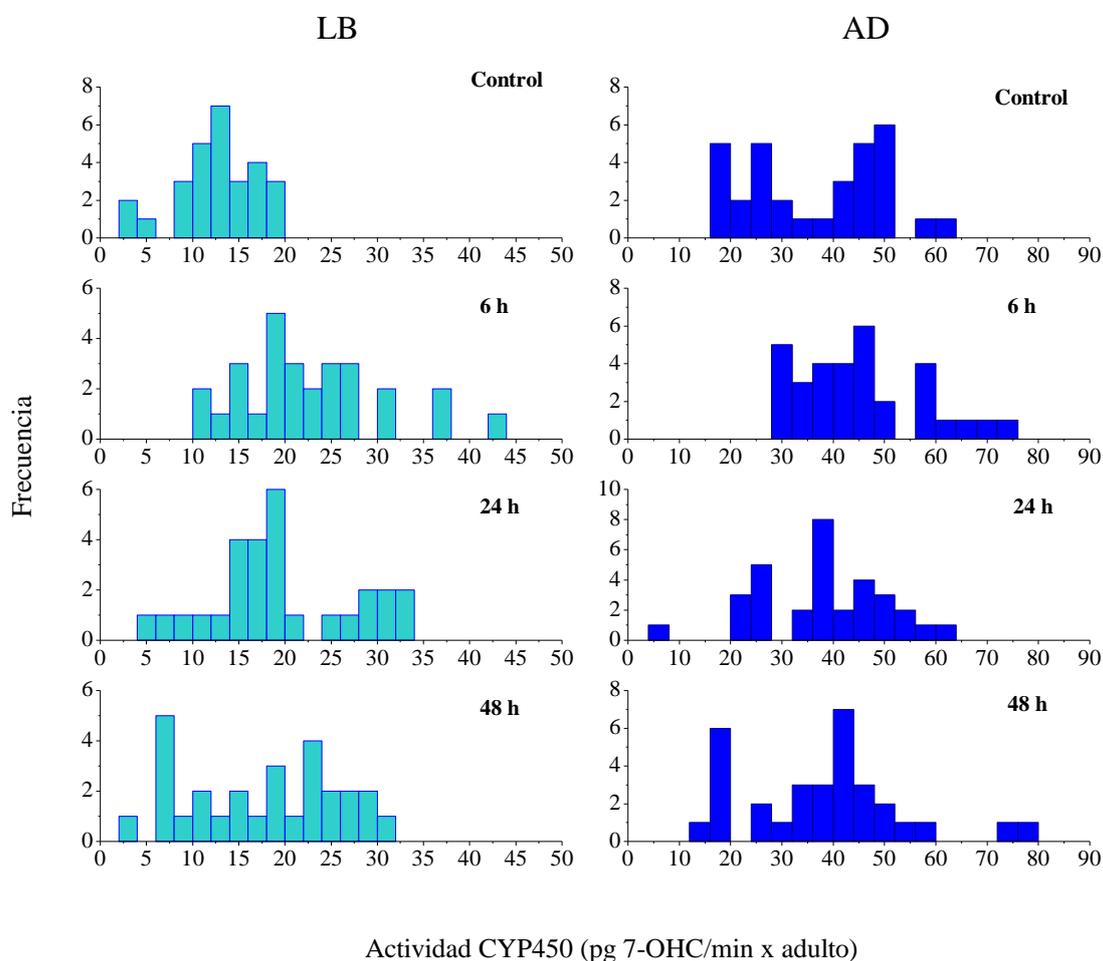


Figura 5.9: Distribución de frecuencias de la actividad CYP450 (pg 7-OHC/min x adulto) en la población LB y AD controles y expuestos a WAF durante 6, 24 y 48 h de exposición a 0,0014 y 0,35 mg/L, respectivamente.

5.4.5. Caracterización cualitativa de esterasas. Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida

La caracterización cualitativa de EST en geles no desnaturizantes permitió identificar cuatro isoformas en anfípodos de *H. curvispina* de LB y AD (Figura 5.10). Dichas poblaciones presentaron diferencias tanto en el patrón de las bandas como en la intensidad de su tinción. En la población LB se visualizaron tres isoformas, EST1, EST2 y EST4, ésta última con una mayor intensidad en la tinción.

Por otra parte, en la población AD se identificaron las isoformas EST1, EST2 y EST3, presentando la mayoría de los individuos una muy baja intensidad de tinción. Además, la población AD mostró una mayor variabilidad en la expresión de las isoformas.

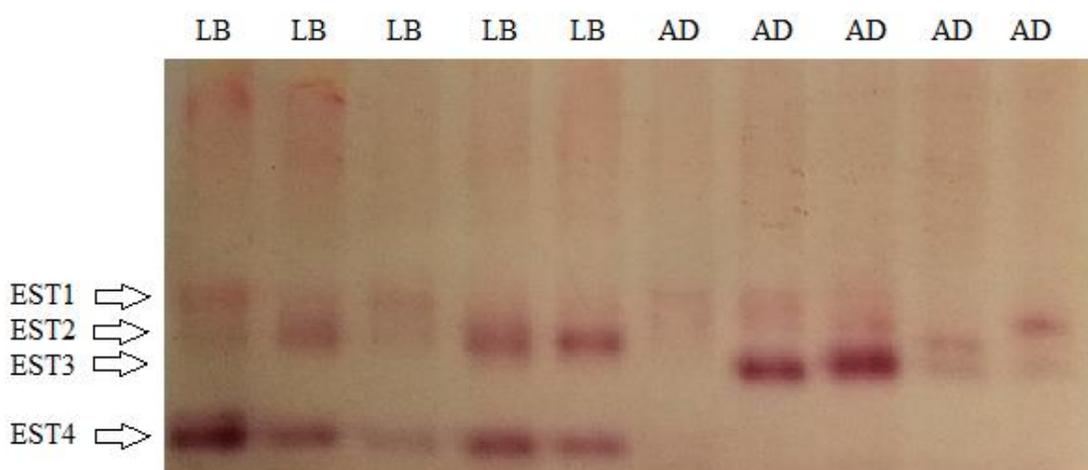


Figura 5.10: Gel nativo de poliacrilamida de la actividad EST de homogenados de *H. curvispina* de LB y AD. Las cinco primeras calles corresponden a individuos de LB y las siguientes, a individuos de AD. EST1: esterasa 1; EST2: esterasa 2; EST3: esterasa 3 y EST4: esterasa 4.

5.4.6. Análisis multivariado del comportamiento de los parámetros bioquímicos en las dos poblaciones

La relación entre las variables analizadas se determinó a través de la matriz de correlaciones (Tabla 5.5). La variable GSH presentó una correlación inversa significativa con CAT ($p=0,027$) y CYP450 ($p=0,013$). La variable CAT mostró una alta correlación directa significativa con CYP450 ($p=0,011$).

Tabla 5.5: Matriz de correlación entre variables. Valores en color rojo indican correlación significativa entre par de variables.

Variable	GSH	GST	CAT	CYP450
GSH	1,00	0,16	-0,63	-0,69
GST	0,16	1,00	-0,24	-0,42
CAT	-0,63	-0,24	1,00	0,70
CYP450	-0,69	-0,42	0,70	1,00

Se utilizó un análisis de componentes principales (ACP) para distinguir entre las poblaciones y evaluar la variabilidad de las respuestas de los distintos parámetros bioquímicos en función de la exposición a una concentración subletal de WAF.

El ACP reorganizó los datos originales en cuatro factores principales y los dos primeros componentes representaron el 85,14% de variabilidad total del sistema (varianza total). La figura 5.11 muestra el aporte de cada variable a los componentes principales seleccionados. La longitud de la línea y el ángulo respecto a los ejes principales, se interpreta como el peso y la relación de cada variable al componente. El primer componente CP1, que explicó el 62,61% de la variabilidad, estuvo fuertemente determinado por las respuestas de GSH, CYP450 y CAT. El segundo componente CP2 se asoció con la actividad GST, lo que explicó el 22,53% de la variabilidad total.

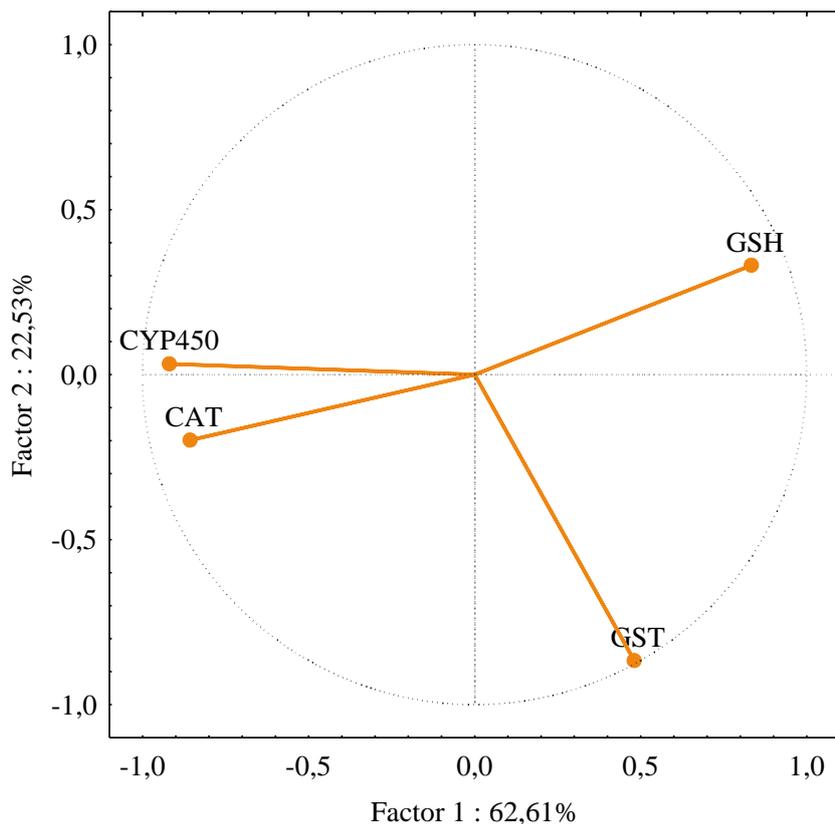


Figura 5.11: Proyección de las variables en el plano principal. Las líneas color naranja indican el aporte de cada variable a los componentes principales.

Se realizó la proyección de los distintos grupos en el plano de los dos componentes principales, consistiendo en los controles y expuestos a tres tiempos para ambas poblaciones de anfípodos. La ordenación de ACP realizada dio como resultado la formación de cuatro grupos (Figura 5.12). En primer lugar, se distinguió la separación neta de las respuestas de las dos poblaciones, determinada por valores positivos de CP1 para LB y por valores negativos para AD. Uno de los grupos estuvo formado por los tres controles de LB (C6, 24 y 48) más el tratado a 6 h (LBT6), y se caracterizó por presentar un alto contenido de GSH y actividad GST con una baja actividad de CAT y CYP450. Un segundo grupo estuvo formado por LBT24 y LBT48, que mostraron un contenido medio de GSH, una baja actividad GST y una actividad intermedia de CAT y CYP450. Un tercer grupo quedó conformado por la mayoría de las muestras de la población AD (ADC6, ADC24, ADC48, ADT6 y ADT24), el cual presentó un bajo contenido de GSH y una actividad alta de GST, CAT y CYP450. Por otro lado, la muestra ADT48 se aisló del grupo anterior de AD principalmente debido a su menor actividad de GST.

A partir de este análisis estadístico descriptivo se observa la respuesta diferencial de ambas poblaciones, que puede estar atribuida a las diferencias fisico-químicas de los sitios donde habitan. Las actividades basales enzimáticas presentan distintos valores, los cuales diferencian a los individuos de ambas poblaciones. La mayoría de las actividades enzimáticas de los anfípodos de AD expuestos a WAF no variaron con respecto a la de sus controles. Por el contrario, la exposición a WAF modificó las actividades enzimáticas en los organismos de LB. Las diferentes respuestas a WAF de ambas poblaciones permite agruparlos de forma separada.

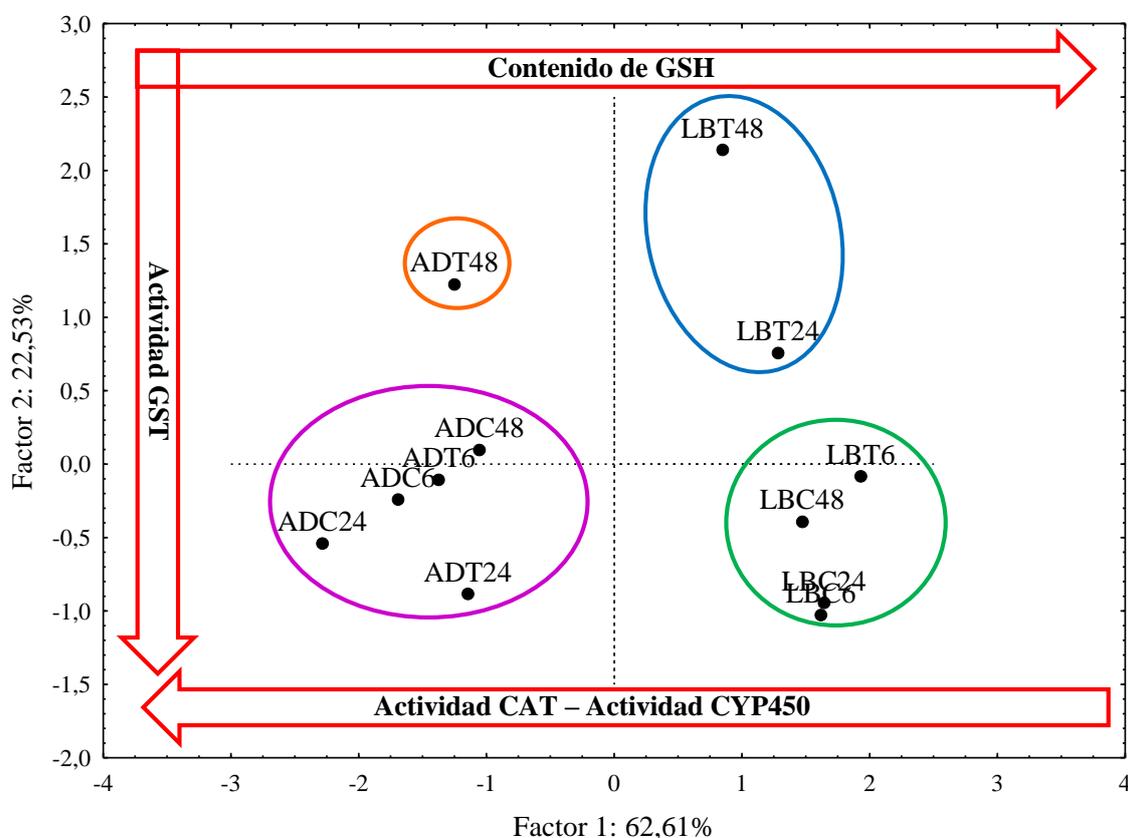


Figura 5.12: Análisis multivariado. Los puntos representan el promedio de las cinco réplicas de cada muestra conformada por 10 individuos. LBC6, LBC24 y LBC48: Individuos LB controles a las 6, 24 y 48 h de exposición; LBT6, LBT24 y LBT48: Individuos LB expuestos a WAF durante 6, 24 y 48 h; ADC6, ADC24 y ADC48: Individuos AD controles a las 6, 24 y 48 h de exposición; ADT6, ADT24 y ADT48: Individuos AD expuestos a WAF durante 6, 24 y 48 h. Los círculos representan los grupos formados. Las flechas indican los gradientes.

5.5. Estudios moleculares

5.5.1. Verificación de la integridad del ARN extraído

La integridad del ARN extraído de las muestras correspondientes a anfípodos LB controles y expuestos a WAF se observó en un gel de agarosa (Figura 5.13). EL ARN se consideró íntegro al visualizarse dos bandas correspondientes a los ARN ribosomales 18S y 28S.

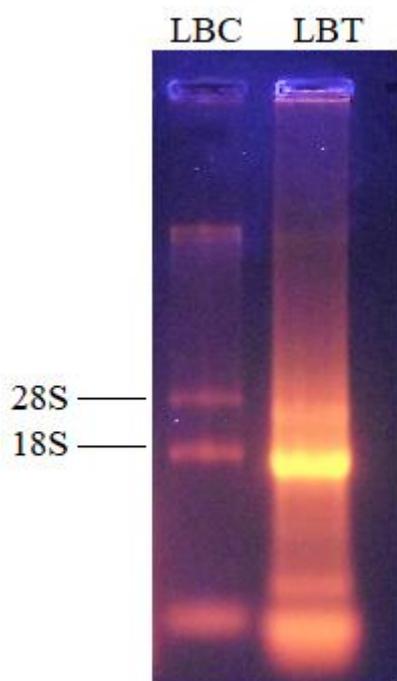


Figura 5.13: Fotografía del gel de integridad de ARN. Se visualizan las bandas del ARN ribosomal 18S y 28S extraído de homogenado de *H. curvispina* del sitio LB. LBC: controles LB; LBT: expuestos LB a WAF.

5.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificó un fragmento de alrededor de 710 pb del gen CYP450. Los productos de PCR correspondientes a las muestras control LB y expuestos LB a WAF se presentan en la figura 5.14. La primera calle del gel corresponde a la banda de CYP450 del grupo

control LB, la segunda calle a la banda de CYP450 del grupo expuesto a WAF LB, y la tercera calle, corresponde al control negativo. En el gel se observó una mayor intensidad de la banda correspondiente al grupo expuesto a WAF de la población LB.

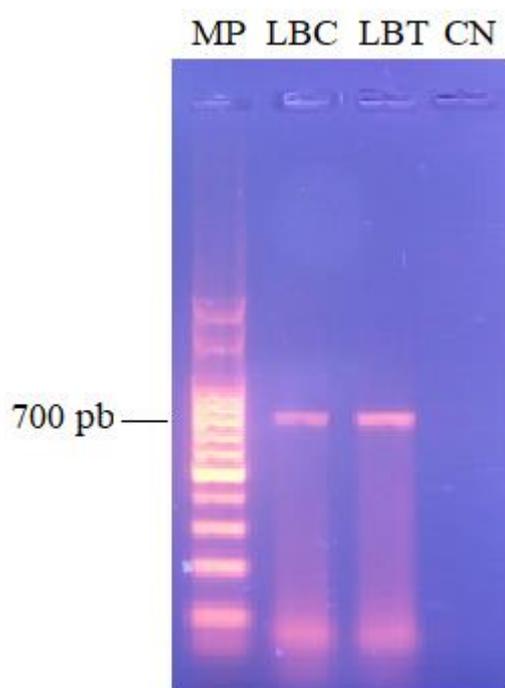


Figura 5.14: Amplificación del gen CYP450. MP: marcador de peso 100 pb a 1000 pb; LBC: controles LB; LBT: expuestos a WAF LB; CN: control negativo.

5.6. Distribución de sensibilidad de especies

La probabilidad de los posibles efectos de la WAF en especies acuáticas se obtuvo a partir de la curva SSD (Figura 5.15). Para la construcción de la SSD, se utilizaron un total de 12 datos de toxicidad, incluido el valor correspondiente a la especie nativa *H. curvispina* del sitio de referencia LB (Tabla 5.6). Los datos de toxicidad incluyeron diferentes especies de organismos de agua dulce. Los datos se ajustaron a un modelo Probit, con un valor R^2 de 0,97. Los crustáceos presentaron la mayor sensibilidad entre los organismos acuáticos, a excepción de *Mysidopsis almyra*. La mayor susceptibilidad a WAF se observó en *H. curvispina* de la población LB. A partir de la ecuación de distribución

ajustada, la concentración que afectaría al 10% de las especies acuáticas se estimó en 0,46 mg/L, mostrando el valor de 96 h-CL50 de *H. curvispina* de LB por debajo de este valor.

Tabla 5.6: Valores de CL50 para diferentes especies expuestas a WAF.

Especie	Grupo Taxa	CL50 mg/L
<i>Hyalella curvispina</i>	Crustacea	0,31 ¹
<i>Gammarus fasciatus</i>	Crustacea	0,80 ²
<i>Homarus americanus</i>	Crustacea	0,86 ³
<i>Salvelinus malma</i>	Peces	1,25 ⁴
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Peces	1,47 ⁴
<i>Thymallus arcticus</i>	Peces	2,04 ⁴
<i>Salvelinus alpinus</i>	Peces	2,17 ⁴
<i>Cottus cognatus</i>	Peces	3,00 ⁴
<i>Daphnia magna</i>	Crustacea	4,32 ⁵
<i>Menidia beryllina</i>	Peces	6,05 ⁶
<i>Mysidopsis almyra</i>	Crustacea	7,65 ⁶
<i>Barbus sp.</i>	Peces	8,60 ⁷

¹Del Brio (presente tesis), 2018.

²Mayer et al., 1986.

³Wells & Sprague, 1976.

⁴Moles et al., 1974.

⁵Ullrich & Millemann, 1983.

⁶Anderson et al., 1974.

⁷Akintonwa & Ebere, 1990.

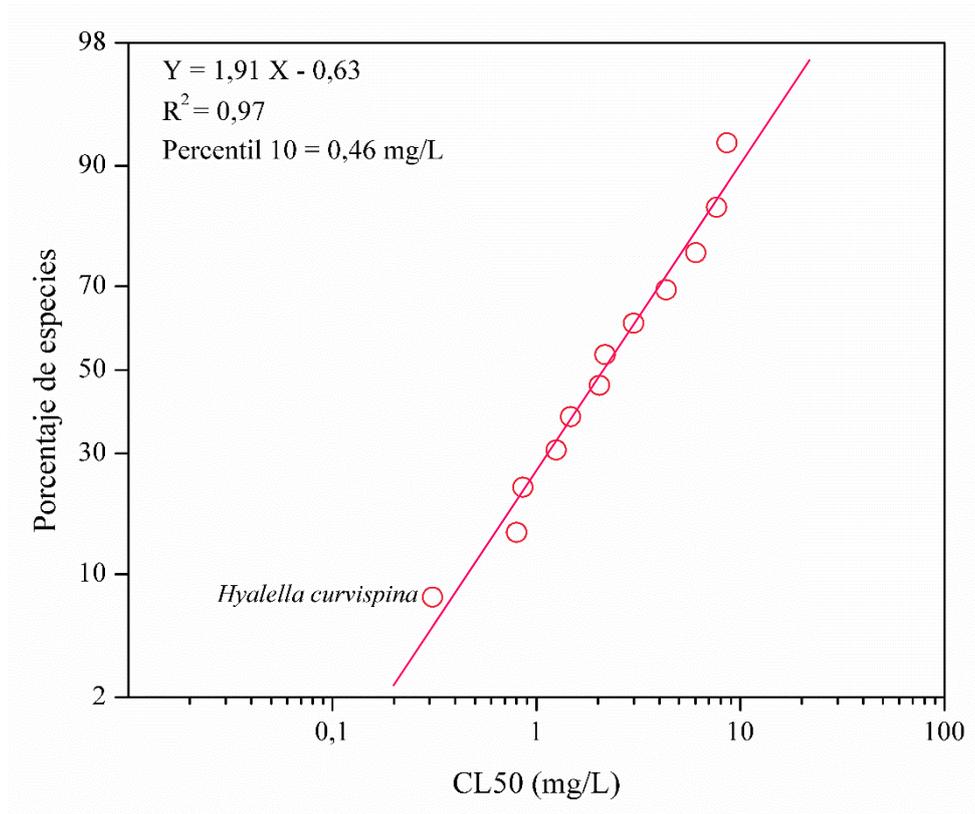


Figura 5.15: Curva de sensibilidade de especies acuáticas para WAF. El valor de toxicidad aguda para *H. curvispina* del sitio LB fue identificado.

DÍSCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1. Análisis de la composición y disipación de la WAF en el tiempo

El petróleo crudo es una mezcla de compuestos con diferentes cantidades de componentes individuales. En los últimos años, la WAF ha sido ampliamente adoptada como la fracción de referencia para evaluar los efectos tóxicos de petróleo crudo en organismos acuáticos. El término "fracción acomodada en agua" (WAF) ha sido definido por el grupo CROSERF (Chemical Response to Oil Spills Ecological Effects Research Forum) como un medio preparado en laboratorio a partir de la mezcla de baja energía (sin vórtex) de un material poco soluble (petróleo o un producto derivado del mismo) que está esencialmente libre de partículas grandes (Aurand & Coelho, 1996; Coelho & Aurand, 1997). Si bien el término WAF se ha utilizado en forma indistinta con el de "fracción soluble en agua" (WSF), se considera más correcto desde el punto de vista técnico el término WAF, porque las soluciones no se someten a métodos físicos (por ejemplo, filtración o centrifugación) para asegurar que se hayan eliminado todas las partículas de petróleo (Singer et al., 2000).

El perfil químico de la WAF suele ser diferente al del petróleo original. Esto se debe a las diferentes solubilidades en agua de sus componentes (Faksness et al., 2008). Muchos factores influyen en la composición y concentración de hidrocarburos presentes en la WAF, principalmente el tipo de petróleo, la relación petróleo-agua, el tiempo de mezcla y la temperatura de exposición (Maher, 1986; Faksness et al., 2008).

En el presente estudio, la concentración total de hidrocarburos en la WAF fue de 2,50 mg/L. Lavarías et al. (2004) informaron una concentración de 3,41 mg/L, utilizando la misma metodología de preparación de WAF a partir de un petróleo crudo de Punta Loyola. Neff et al. (2000) indicaron concentraciones que varían de 0,008 a 38,31 mg/L para diferentes petróleos de Australia. La composición de la WAF del presente estudio mostró altas concentraciones de BTEX y bajas concentraciones de PAHs. Una composición similar se ha informado en otros estudios (Anderson et al., 1974; Lavarías et al., 2004; Simonato et al., 2008). Por el contrario, otros autores han encontrado altas concentraciones de PAHs en la WAF, donde el naftaleno representa el mayor porcentaje de ellos (Neff et al., 2000; Rodrigues et al., 2010). Dentro del grupo BTEX, el tolueno presentó una concentración mayor que el resto de compuestos. Zhou et al. (1994)

determinaron en la WAF mucho más tolueno que benceno a pesar de que su solubilidad es tres veces menor.

El análisis de disipación de hidrocarburos en la WAF del presente estudio mostró una concentración inicial pequeña de naftaleno, la cual disminuyó rápidamente después de las primeras 6 h (por debajo de los límites de detección). Otros autores también han mostrado una disminución importante en las concentraciones de naftaleno medidas en agua después de 24 h (Laughlin et al., 1978). La presión de vapor es una propiedad importante involucrada en el comportamiento de PAHs en el medio ambiente. Los PAHs con alta presión de vapor, como el naftaleno (11 Pa a 25 °C), van a tender a asociarse con la fase de vapor. Por otro lado, aquellos con menor presión de vapor, tenderán a ser adsorbidos por las partículas (Abdel-Shafy & Mansour, 2016). A pesar de su baja persistencia debido a la alta volatilidad, los PAHs están biodisponibles y pueden causar efectos tóxicos en muchos organismos (Smreczak et al., 2008).

La tasa de disipación de hidrocarburos del presente estudio mostró una cinética de primer orden. Los valores de $t_{1/2}$ de los componentes de la WAF variaron en un rango de 65 a 200 h. O-xileno fue el componente de la WAF que exhibió el $t_{1/2}$ más alto, que se correlaciona con su baja presión de vapor. El tolueno mostró el valor $t_{1/2}$ más pequeño (65 h). Sin embargo, su alta concentración dentro del grupo BTEX podría influir en la manifestación de los efectos tóxicos hasta alcanzar la completa disipación a las 192 h. Estudios previos han indicado que el tolueno se volatiliza rápidamente del agua al aire, con un corto $t_{1/2}$ a temperatura ambiente (25 °C). Sin embargo, la tasa de volatilización depende de las condiciones de la masa de agua y la atmósfera (U.S. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2015). Tanto el xileno como o-xileno mostraron un $t_{1/2}$ mayor que los otros componentes.

6.2. Caracterización físico-química de los sitios de muestreo

La concentración y distribución de los compuestos químicos, tales como nutrientes, presentes en los ecosistemas acuáticos pueden ser influenciados por propiedades físicas tales como la temperatura, turbidez y la corriente. Las interacciones de las propiedades físicas y químicas del agua ejercen una fuerte influencia en la composición, distribución y abundancia de organismos acuáticos. La presencia o ausencia de un compuesto químico puede ser un factor limitante en la productividad de los ambientes acuáticos. Por otro lado, una concentración elevada o baja de un determinado compuesto químico, podría

influir en la abundancia de las especies acuáticas (Mustapha & Omotosho, 2005). Algunos estudios han mostrado que una concentración alta de nutrientes (nitrógeno y fósforo) es indicativo de procesos de eutrofización, que conllevan a una proliferación de algas, desoxigenación y muerte de las especies más sensibles (Vonlanthen et al., 2012; Dong et al., 2013).

Los parámetros físico-químicos más importantes que afectan la calidad del agua y constituyen factores limitantes para la supervivencia de organismos acuáticos son la temperatura, el oxígeno disuelto, el pH, la turbidez, la alcalinidad y los nutrientes (Omaka et al., 2014).

El pH es un indicador importante de calidad de agua e influye en los procesos biológicos y químicos dentro del cuerpo de agua (Chapman, 1996). El pH de la mayoría de las aguas naturales está en el rango de 6,0-8,5. Se ha reportado que el aumento del pH parece estar asociado con el uso creciente de detergentes alcalinos en áreas residenciales y material alcalino de aguas residuales en áreas industriales (Chang, 2008). En los sitios de muestreo LB y AD, el pH del agua fue de 8,15 y 7,47, respectivamente.

La temperatura del agua está influenciada por muchos factores, como la hora del día, la estación, la latitud, la circulación del aire, la profundidad y el caudal del cuerpo de agua (Chapman, 1996). El aumento de la temperatura del agua acelera las reacciones químicas, reduce la solubilidad de los gases y eleva la actividad metabólica de los organismos (Usharani et al., 2010). Las temperaturas promedio medidas en LB y AD fueron similares (20 ± 1 °C) y se encuentran en el rango de valores medidos en estudios anteriores (Monza, 2009).

La conductividad puede definirse como la capacidad de una solución para conducir la corriente eléctrica (Fondriest Environmental Inc., 2014). Constituye un método efectivo y rápido para medir el total de iones disueltos y está directamente relacionado con los sólidos totales. Cuanto mayor es el valor de los sólidos disueltos, mayor es la cantidad de iones en el agua (Bhatt et al., 1999). En el presente estudio, la conductividad eléctrica en AD fue siete veces mayor que en LB (1250 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Monza (2009) determinó valores de conductividad eléctrica elevados en distintos puntos de muestreo a lo largo del arroyo Durán (1115 ± 144 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Los valores de conductividad eléctrica pueden ser extremadamente altos en aguas contaminadas o que reciben una gran cantidad de escorrentía urbana (UNEPGEMS, 2008).

El oxígeno disuelto es un parámetro físicoquímico importante que influye en la supervivencia de la vida acuática. Las aguas superficiales no contaminadas generalmente

están saturadas con oxígeno disuelto (7,5-10 mg/L a 25 °C), pero el mismo se puede eliminar rápidamente por la demanda de oxígeno de los residuos orgánicos. Variaciones en las concentraciones de oxígeno disuelto pueden ser un indicador temprano de algún cambio en el cuerpo de agua. La concentración de oxígeno disuelto inferior a 5 mg/L resulta dañina para los organismos acuáticos (Pearce et al., 1999; Das, 2000). Los valores de oxígeno disuelto fueron de 7,4 a 5,2 mg/L en los sitios LB y AD, respectivamente. El valor correspondiente a AD podría afectar las especies más susceptibles a la falta de oxígeno.

La presencia de materia orgánica influye en la concentración de oxígeno disuelto, dado que puede reducir drásticamente el mismo (Chapman, 1996). El contenido elevado de materia orgánica encontrado en AD (10,2%) podría estar vinculado a la menor concentración de oxígeno disuelto. El porcentaje elevado de materia orgánica puede atribuirse a que las márgenes del arroyo presentan una densa vegetación ribereña, la cual genera aportes orgánicos tanto vía aérea como radicular.

Los valores correspondientes a los parámetros físico-químicos registrados en el sitio de muestreo LB se encontraron dentro de un rango adecuado para el funcionamiento de dicho ecosistema. Si bien en AD se determinaron altos valores de conductividad eléctrica y contenido de materia orgánica, y menor concentración de oxígeno disuelto, dichos valores estarían por debajo de los límites de protección de la vida acuática (Chapman, 1996; Das, 2000; Johnson et al., 2007).

El lago LB mostró las características de aguas superficiales que responden a su alimentación andina de su principal tributario el Río Neuquén y a la cuenca donde se inserta eminentemente árida y con gran evaporación. El arroyo Durán puede responder con elevada salinidad y pH debido a que su desarrollo hidrográfico es exclusivamente de alimentación de zona árida y de balance hídrico negativo.

La concentración de TPHs en los sedimentos colectados en LB fue de 32,74 mg/kg ps y los mismos estuvieron representados principalmente por alcanos de alto peso molecular con cadenas impares. Estos resultados son similares a los reportados en estudios previos realizados en el área (Monza et al., 2013). En general, los alcanos impares provienen de fuentes biogénicas, mientras que los alcanos pares se derivan de fuentes antropogénicas. Dentro de los alcanos impares, n-C15, n-C17 y n-C19 son producidos por fuentes biogénicas y n-C25-n-C33 provienen del aporte de plantas vasculares (Rielley et al., 1991; Sakari et al., 2008).

Las muestras de sedimento recolectadas de AD mostraron una alta concentración de TPHs (900,07 mg/kg ps). Tanto las concentraciones de PAHs como BTEX estuvieron por debajo de los límites de detección, aunque estudios previos mostraron concentraciones de naftaleno y pireno de 40 µg/kg ps y 50 µg/kg ps, respectivamente (Monza et al., 2013). Estos autores atribuyeron los niveles de hidrocarburos de las muestras a la actividad antropogénica.

6.3. Estudios toxicológicos

La contaminación por petróleo puede causar serios problemas a la vida acuática. La mayoría de las investigaciones toxicológicas sobre la contaminación con petróleo crudo ha revelado que su toxicidad es causada principalmente por la WAF, en lugar de las gotas dispersas de la fracción (Zhou et al., 1994).

Debido a la gran variabilidad en la composición del petróleo y los métodos de preparación, los resultados toxicológicos de diferentes WAF son difíciles de comparar. Para obtener una WAF de petróleo que sea reproducible y comparable para los estudios de toxicidad aguda y crónica, deben controlarse variables como la relación petróleo-agua y el tiempo de mezcla y decantación (Maher, 1986). Además, se requieren preparaciones nuevas en cada ensayo para evitar cambios en la concentración de la WAF que puedan ocurrir durante el almacenamiento (Heras et al., 1995).

En el presente estudio se determinó la toxicidad aguda y crónica de la WAF en un anfípodo nativo. La población de *H. curvispina* recolectada en el área de referencia (LB) fue mucho más sensible a WAF en relación a la que habita en el sitio contaminado (AD). Más aún, no se registró mortalidad de anfípodos recolectados en AD tanto en exposiciones agudas como en crónicas a WAF. La diferencia en la toxicidad podría deberse a la adquisición de una mayor tolerancia por aclimatación fisiológica, adaptación genética o efectos maternos. Si bien los niveles basales de las dos poblaciones fueron significativamente diferentes, se requieren más estudios para determinar si la actividad de estas enzimas está constitutivamente aumentada (por mutaciones puntuales, amplificación génica y regulación positiva transcripcional) o la expresión de las mismas se encuentra momentáneamente inducida por la presencia de algún tóxico en el ambiente. Se han detectado cambios no genéticos (aclimatación fisiológica), como la inducción en la actividad enzimática en varias especies de crustáceos y peces (Rewitz et al., 2003; Martínez-Gómez et al., 2009; Jung & Di Giulio, 2010). El desarrollo de resistencia a

PAHs se ha demostrado en poblaciones de peces *F. heteroclitus* (Lindberg et al., 2017). Por otra parte, Hall & Oris (1991) observaron que el antraceno reduce el potencial reproductivo y se transfiere por vía materna durante la exposición a largo plazo en peces. A pesar de las diferencias en la composición de las WAF obtenidas de diferentes crudos, la población LB ha demostrado ser más sensible que otros anfípodos, tales como los adultos de *Gammarus fasciatus* con una CL50 de 0,80 mg/L (Mayer & Ellersieck, 1986). Se reportaron valores altos de 96 h-CL50 para otros crustáceos tales como *M. almyra* (7,65 mg/L), *Penaeus aztecus* (4,9 mg/L), *P. pugio* (3,5 mg/L), *H. americanus* (0,86 mg/L) y *P. monodon* (8,52 mg/L) (Anderson et al., 1974; Wells & Sprague, 1976; Akbari et al., 2004). Lavarías et al. (2004) determinaron una 96 h-CL50 de 1,56 mg/L para el decápodo *M. borellii*. Martínez-Jerónimo et al. (2005) determinaron valores de toxicidad aguda en *D. magna* entre 254 y 640 mg/L para siete crudos diferentes de México. Estudios más recientes en crustáceos mostraron valores de toxicidad aguda a WAF de 4 mg/L para *M. vollenhovenii* y 5 mg/L para *M. macrobrachion* (Ekanem et al., 2011).

La mayoría de los estudios de toxicidad de hidrocarburos en organismos acuáticos se han realizado bajo condiciones de exposición aguda (corta duración). Sin embargo, en los ecosistemas acuáticos, los organismos se encuentran generalmente expuestos a estos contaminantes en bajas concentraciones durante todo su ciclo de vida o en múltiples generaciones. Por lo tanto, es muy importante también evaluar los efectos subletales y crónicos de los hidrocarburos del petróleo. En el presente estudio se determinó una toxicidad crónica (CL50) a WAF de 0,018 mg/L para los anfípodos recolectados en el sitio LB. Brown et al. (2017) reportaron valores de toxicidad crónica (CL50) de 0,15 mg/L y 0,38 mg/L en juveniles y adultos del anfípodo *Paramoera walkeri*, respectivamente. Martínez-Jerónimo et al. (2005) determinaron la toxicidad crónica de siete tipos de petróleo crudo en el cladóceros *D. magna* durante 21 d de exposición. Los valores variaron de 5 a 144,8 mg/L. La toxicidad de la WAF (CL50) en juveniles de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) expuestos durante 28 d fue de 1,74 mg/L (Rudolph et al., 2001).

En la presente tesis se estimaron valores de NOEC de 0,00043 mg/L y LOEC de 0,014 mg/L para la exposición aguda a WAF en los anfípodos de LB. Varios estudios realizados han mostrado menor susceptibilidad a WAF en otros crustáceos (Gulec et al., 1997; Barron et al., 1999a, 1999b; Currie, 2018). Lee et al. (2005) estimaron estos parámetros toxicológicos en el anfípodo bentónico *Grandidierella japonica* por exposición a varios

PAHs (acenafteno, criseno, fluoranteno, fluoreno, naftaleno, fenantreno y pireno), siendo el pireno el de mayor toxicidad.

Dentro del grupo BTEX, el tolueno fue el principal componente de la WAF en este estudio, con una concentración de 0,24 mg/L. Los datos de toxicidad aguda de tolueno informados por la ECOTOX varían en un rango de 447 mg/L (*G. minus*) a 58 mg/L (*Diatomus forbesi*) para crustáceos, cuyos valores son varios órdenes de magnitud mayor que los valores de toxicidad aguda de WAF (0,31 mg/L a 7,65 mg/L). Esto podría indicar que la mezcla de compuestos presentes en la WAF es más tóxica que los compuestos individuales. La exposición a mezclas químicas de solubilidad diferente, probablemente produzca reacciones que pueden no estar asociadas con los productos químicos individuales. En general, la exposición a mezclas químicas produce un efecto mayor que la suma de sus efectos individuales (Zeliger, 2003). Se han demostrado efectos sinérgicos para mezclas de PAHs en anfípodos (Boese et al., 1999) y en estadios tempranos de vida de peces (Barron et al., 2004).

El objetivo de la SSD es determinar la concentración de un tóxico que protege a la mayoría de las especies en el medio ambiente. Dentro de la curva SSD, se debe prestar atención a la concentración correspondiente al 10% de las especies afectadas, dado que determina la seguridad para la mayoría de las especies por debajo de dicho valor (Xin et al., 2015). El décimo percentil de la distribución de toxicidades agudas para las especies se usa generalmente como punto final de evaluación de acuerdo con Aquatic Risk Assessment and Mitigation Dialog Group (SETAC, 1994).

Aunque las SSDs se utilizan con frecuencia en las evaluaciones de riesgos ecológicos para la formulación de niveles guía de calidad del agua (Wheeler et al., 2002), su uso en la regulación de la contaminación por petróleo y las evaluaciones de impacto ha sido limitado. Estudios previos han demostrado que el desarrollo de SSD para petróleo es factible y puede ser útil para evaluar la sensibilidad de las especies acuáticas a petróleo (Smit et al., 2009; de Hoop et al., 2011). Además, Barron et al. (2013) desarrollaron SSDs para 5 petróleos diferentes y petróleos combinados, y sus hallazgos mostraron valores similares de Concentraciones de Peligro para el 5% de las especies (HC5 = Hazardous Concentration). Estos resultados sugieren que las SSDs para WAF son factibles de realizar combinando los valores de toxicidad de diferentes petróleos.

En el presente estudio, el valor del 10% resultante de la SSD podría servir como base para establecer un nivel de referencia local de toxicidad para WAF. En este sentido, los resultados actuales sugieren que las concentraciones de TPHs en agua dulce no deben

exceder 0,5 mg/L para proteger a la mayoría de las especies acuáticas. Se ha propuesto una concentración máxima permitida de 50 µg/L de TPHs como un estándar de calidad ambiental para agua de mar (Țigănuș et al., 2016). Teniendo en cuenta que las exposiciones a largo plazo pueden surgir de derrames de petróleo u operaciones de perforación, se deben considerar los efectos crónicos. Los puntos finales de bioensayos de *H. curvispina* sugieren que las concentraciones de TPHs del orden de 10 µg/L son suficientes para causar efectos adversos (14 d-CL50), mientras que un valor de 0,2 µg/L no debe excederse para evitar toxicidad crónica en esta especie.

6.4. Efectos subletales de WAF en *H. curvispina*

En los últimos años, ha tomado relevancia el estudio de los efectos subletales de un tóxico en los organismos para alcanzar un análisis completo de su impacto (Desneux et al., 2007). Como se mencionó anteriormente, los efectos subletales se definen como los efectos fisiológicos y de comportamiento en los individuos que sobreviven a la exposición de un tóxico (dosis/concentración de un tóxico puede ser subletal o letal). La dosis/concentración subletal se define como aquella que produce una mortalidad, la cual no es estadísticamente diferente de la población control. En el presente trabajo se evaluaron los efectos subletales de WAF sobre los parámetros bioquímicos y moleculares en dos poblaciones de anfípodos.

Los cambios significativos en los niveles de GSH pueden ser un importante indicador de la capacidad de detoxificación de los organismos (Stara et al., 2012). El contenido basal de GSH en anfípodos de AD fue significativamente menor (82,66%) que el de LB. Los organismos de AD se encuentran expuestos a hidrocarburos en su hábitat natural, por lo cual la disminución en el contenido de GSH podría deberse a varias razones: (a) la conjugación de estos xenobióticos con GSH, (b) menor síntesis de GSH debido a la exposición a estos contaminantes, (c) su conversión a la forma oxidada GSSG como resultado de las EROS (Yin et al., 2007; Milinkovitch et al., 2011). Varios estudios han mostrado una disminución en el contenido de GSH por exposición a xenobióticos. Zhang et al. (2004c) evaluaron los efectos continuos de WAF sobre las defensas antioxidantes de *Carassius auratus* durante un período de 40 d. Ellos observaron un decrecimiento en los niveles de GSH a los 10 d de exposición. Zhang et al. (2004a) encontraron una disminución del contenido hepático de GSH en la exposición de *C. auratus* a 2,4-diclorofenol durante 40 d. En concordancia con este estudio, la exposición a fenantreno

produjo un decrecimiento en el contenido de GSH en estos organismos acuáticos (Yin et al., 2007).

Por otro lado, la exposición a WAF produjo un aumento en el contenido de GSH tanto en los anfípodos de LB como AD en relación a sus respectivos controles. En ambas poblaciones, el mayor incremento se observó en las primeras 6 h de exposición, lo cual indicaría un rol protector de GSH contra el estrés oxidativo inducido por WAF. Además, los aumentos significativos observados en el contenido de GSH podrían indicar que el GSH es regenerado de su forma oxidada (GSSG) por la GR. En general, el contenido de GSH ofrece una primera línea de defensa frente al estrés oxidativo en los organismos vivos. El estrés oxidativo ligero puede inducir el aumento de la síntesis de GSH y las actividades enzimáticas detoxificantes, mientras que un estrés oxidativo severo puede causar la oxidación de GSH a GSSG, y la disminución de las enzimas antioxidantes (Elia et al., 2006).

Cambios similares en el contenido de GSH han sido reportados por otros autores. Wu et al. (2011) mostraron aumentos significativos en el contenido de GSH por la exposición a hidrocarburos en *D. magna*. Hasselberg et al. (2004) observaron que los niveles de GSH se incrementaron en hembras del pez *Gadus morhua* después de una semana de exposición a alquilfenoles.

Además de los hidrocarburos, otros xenobióticos han producido cambios en los niveles de GSH en anfípodos. La exposición aguda al plaguicida metil azinfos incrementó significativamente el contenido de GSH en *H. curvispina* (Anguiano et al., 2012). Un estudio realizado en el anfípodo *G. pulex* determinó concentraciones elevadas de GSH como consecuencia de la exposición individual y combinada a cadmio (Cd) y arseniato (AsV) (Vellinger et al., 2013).

Si bien los diferentes xenobióticos pueden causar cambios en el contenido de GSH de los organismos acuáticos, los factores bióticos y abióticos del medio también pueden hacerlo. Gismondi et al. (2012) estudiaron la influencia del género y las estaciones del año sobre la concentración de GSH y las reservas de energía en el gamárido de agua dulce *G. roeseli*. Los autores encontraron que estos parámetros fueron más altos en las hembras y durante los meses más fríos del año. Asimismo, sugieren que, a partir de sus resultados, sería prudente considerar estos factores en los estudios ecotoxicológicos que utilizan gamáridos como modelos biológicos, con el fin de interpretar las respuestas de los biomarcadores de la forma más correcta posible.

Las enzimas GST son multifuncionales y están involucradas tanto en la detoxificación de muchos xenobióticos, como en la protección contra el daño oxidativo causado por EROS (Kim et al., 2009). Muchas de las isoenzimas de GST pueden ser inducidas por contaminantes, pero en otros casos pueden inhibirse frente a sustancias químicas y mezclas puras (NIVA, 2006).

Los resultados del presente estudio mostraron diferencias significativas en la actividad GST basal entre ambas poblaciones. Esta actividad, al igual que el contenido de GSH, fue menor en los anfípodos de AD con respecto a LB. Asimismo, la exposición a WAF durante 24 y 48 h produjo una disminución en la actividad GST de los organismos de LB respecto a sus controles. Este decrecimiento en la actividad sugiere una falla en la respuesta adaptativa (Song et al., 2006).

La disminución de GST, como resultado del daño oxidativo en organismos acuáticos, también se observó en *Cyprinus carpio* expuesto a hexaclorobenceno (Song et al., 2006) y a WAF durante 40 d (Zhang et al., 2004c). Uguz et al. (2003) mostraron un decrecimiento en la actividad GST en la trucha arcoíris por exposición a nonilfenol. La exposición a dosis bajas de alquilfenol produjo una disminución de la actividad GST en machos de la especie *G. morhua* (Hasselberg et al., 2004).

En la población AD, la actividad GST no mostró diferencias significativas con respecto a su control en ninguno de los tres tiempos de exposición. Esta falta de respuesta de GST podría estar relacionada con una menor actividad de GR *in vivo* en el organismo, lo que podría disminuir la capacidad de reciclaje de GSH. Como se mencionó anteriormente, el contenido basal de GSH en estos anfípodos estaba disminuido con respecto al de LB. La disminución relativa de la actividad GST puede estar relacionada con bajos niveles de GSH susceptibles de conjugarse (Carvalho et al., 2012).

Las enzimas CAT protegen a los organismos del daño oxidativo mediante la eliminación de EROS. Cuando los organismos son expuestos a contaminantes como los hidrocarburos, se produce un incremento de las EROS que conlleva a un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes como CAT y SOD. La SOD cataliza la dismutación del anión superóxido para producir peróxido de hidrógeno, el cual es metabolizado por CAT (Matés, 2000).

La actividad basal CAT en anfípodos de AD fue significativamente mayor (345,73%) con respecto a la de LB. En la población LB, la actividad CAT aumentó en forma creciente respecto a su control en los tres tiempos de exposición a WAF. Por el contrario, la actividad CAT en AD disminuyó a las 24 h de exposición.

Varios estudios han reportado una inducción en la actividad CAT de diferentes especies causada por la exposición a hidrocarburos. Han et al. (2014) investigaron los efectos de la WAF en las actividades antioxidantes del copépodo *T. japonicus*. Ellos observaron un incremento de la actividad CAT en forma dependiente a la dosis. La exposición a WAF durante 4 y 7 d incrementó significativamente la actividad CAT en el crustáceo *M. borellii* (Lavarías et al., 2011). Sandrini-Neto et al. (2016) mostraron incrementos en la actividad CAT a altas dosis de petróleo en el gasterópodo *Neritina virgínea* y a bajas dosis en el poliqueto *Laeonereis culveri*. Las actividades CAT aumentaron significativamente en *D. magna* expuesta a bajas concentraciones de diésel, las cuales sugieren la generación y acumulación de H₂O₂ en estos organismos (Wu et al., 2011). La exposición del pez *Clarias garipinus* durante 14, 21 y 28 d a petróleo crudo produjo un aumento, dosis dependiente, en la actividad CAT tanto en hígado como en otros órganos (Achuba & Osakwe, 2003).

Se sabe que el estrés oxidativo es un mecanismo importante de toxicidad inducido por los PAHs y que también conduce a cambios en el sistema antioxidante de los organismos. La exposición a fenantreno indujo las actividades de SOD y CAT en *C. auratus* (Yin et al., 2007). Vasanth et al. (2012) reportaron que las actividades de las enzimas antioxidantes, como CAT y SOD, se incrementaron gradualmente al aumentar la concentración de antraceno en *Labeo rohita*. Estos autores concluyen que el aumento en la actividad enzimática, dependiente de la concentración del tóxico, podría considerarse una manifestación del estrés oxidativo causado por el antraceno.

Todos estos resultados demuestran que los hidrocarburos de petróleo son mediadores potentes de la formación de radicales libres en los organismos acuáticos y que el aumento de la actividad CAT puede representar una respuesta adaptativa para protegerlos de la toxicidad de los radicales libres inducidos por estos hidrocarburos.

El sistema CYP450 comprende una superfamilia de enzimas ubicuas, las cuales cumplen un papel crucial en las múltiples rutas metabólicas de los compuestos químicos endógenos y exógenos. La expresión de los genes CYP puede ser inducida por xenobióticos que se unen a las proteínas receptoras, lo que a su vez produce un aumento en la síntesis de proteínas y la actividad enzimática relacionada (Honkakoski & Negishi, 2000).

Actualmente, las enzimas CYP se han estudiado principalmente como potenciales biomarcadores de exposición/efecto a diversos contaminantes en varias especies acuáticas. La inducción de las actividades CYP se ha utilizado como biomarcador de la exposición a xenobióticos (Martínez-Gómez et al., 2009; Webb, 2011), mientras que la

sobreexpresión de los genes P450 se ha atribuido a mecanismos de resistencia (Lindberg et al., 2017).

Las enzimas CYP son inducibles por contaminantes como los hidrocarburos. En este trabajo, la actividad CYP450 en anfípodos del sitio impactado AD fue tres veces mayor con respecto a la de LB. Resultados similares fueron reportados por Leggieri et al. (2017), quienes evaluaron los niveles de expresión de ARNm de CYP1A en truchas arcoíris capturadas en un arroyo patagónico afectado por un derrame de petróleo. Sus resultados indicaron niveles de expresión significativamente más altos en hígado y branquias de los organismos recolectados aguas debajo del derrame de petróleo (sitio impactado) en relación a los capturados en el sitio control (aguas arriba).

La actividad CYP450 en anfípodos de LB aumentó en forma significativa, respecto a su control, en todos los tiempos de exposición, mientras que en los organismos de AD, no se modificó en ninguno de ellos. La inducción de la actividad enzimática CYP450 por la exposición a hidrocarburos ha sido reportada en varias especies de crustáceos. Oberdörster et al. (2000) observaron una elevada actividad CYP1A en camarones machos de la especie *P. pugio* expuestos a pireno durante 6 semanas. La expresión del gen CYP330A1 se indujo en hepatopáncreas de cangrejos machos por la exposición a B[a]P (Rewitz et al., 2003). Webb (2011) evaluó el efecto de la exposición a B[a]P en la actividad CYP450 del crustáceo de agua dulce *P. australis*. Sus resultados evidenciaron una inducción significativa de la actividad en forma dependiente de la concentración. En el copépodo *T. japonicus*, tres genes de la familia CYP se indujeron significativamente por exposición a WAF de una manera dependiente al tiempo y la concentración. Dichos genes representan biomarcadores potenciales de contaminación por petróleo (Han et al., 2014).

La exposición a WAF indujo la expresión de genes CYP en las especies de poliquetos *Capitella capitata* (CYP4 y CYP331) y *Perinereis nuntia* (CYP431A1, CYP432A1, CYP4DU1) (Li et al., 2004; Won et al., 2013). Además, Won et al. (2013) sugirieron que los genes CYP de *P. nuntia* son posibles biomarcadores de PAHs de alto peso molecular. En peces, la inducción de CYP1A1 es un indicador potente de la exposición a contaminantes persistentes como los hidrocarburos presentes en la columna de agua, sedimentos y cadena alimentaria. Varios autores han reportado aumentos en la actividad CYP450 en estos organismos. Cheikyula et al. (2008) expusieron a tres especies de peces a PAHs durante 10 d y observaron una inducción significativa en la actividad CYP450 en cada una de ellas. En adultos y larvas de la especie *F. heteroclitus* expuestos a PAHs,

particularmente B[a]P, esta actividad se incrementó en forma significativa (Jung & Di Giulio, 2010). Crowe et al. (2014) evaluaron el efecto de WAF en *F. grandis* y demostraron una inducción significativa en la expresión de CYP1A a las 12, 24 y 48 h de exposición. Ellos sugieren que los resultados de su estudio confirman el uso de CYP1A como biomarcador en esta especie modelo para monitorear y proteger los recursos alimenticios acuáticos luego de la contaminación con hidrocarburos.

Las EST son un grupo de enzimas involucradas en importantes procesos fisiológicos de los organismos. Particularmente en los crustáceos, estas enzimas desempeñan un papel importante en varios procesos metabólicos involucrados en algunas funciones del hepatopáncreas, como la detoxificación de xenobióticos y la digestión (Lima et al., 2013). Los plaguicidas OF y Carb se consideran los inhibidores más potentes de la colinesterasa. Sin embargo, en los últimos años, se ha informado cada vez más sobre la inhibición de la AChE en crustáceos por una variedad de contaminantes ambientales como los metales pesados, hidrocarburos (particularmente PAHs), detergentes y componentes de mezclas complejas de contaminantes (Diamantino et al., 2003; Rodrigues et al., 2013). Si bien los hidrocarburos son inhibidores potenciales de la actividad EST, el mecanismo de acción no está del todo claro aún (Rodrigues et al., 2013).

En este trabajo, la caracterización de EST en geles no desnaturizantes de poliacrilamida permitió identificar 4 isoformas de EST en juveniles de *H. curvispina* de LB y AD. Dichas poblaciones presentaron diferencias tanto en el patrón de las bandas como en la intensidad de su tinción. En la población LB se visualizaron tres isoformas EST1, EST2 y EST4, ésta última con una mayor intensidad en la tinción. Por otra parte, en la población AD se identificaron las isoformas EST1, EST2 y EST3. La diferencia en la expresión de las isoformas en los individuos de AD podría deberse a la presencia de contaminantes en el sitio. Más aún, los individuos presentaron en general una muy baja intensidad de tinción de las isoformas, lo cual podría indicar la inhibición de las mismas. Varios trabajos han mostrado que la exposición a hidrocarburos en organismos acuáticos produce una reducción en la actividad EST, en particular de la AChE. Akaishi et al. (2004) demostraron que la WAF disminuyó en forma significativa la actividad AChE durante la exposición aguda en peces de agua dulce. En consecuencia, los autores sugieren que la WAF podría alterar las respuestas motoras de estos individuos. Bocquené et al. (2004) observaron que la actividad AChE en los mejillones azules disminuyó durante un año luego de la exposición a petróleo crudo que llegó a la costa después del naufragio del buque petrolero "Erika" en Bretaña (Francia). La exposición a pireno en peces de la

especie *Pomatoschistus microps* causó una inhibición significativa de la colinesterasa (ChE) muscular y de AChE en la cabeza, a una de las concentraciones evaluadas. Estos hallazgos sugieren que pireno puede causar neurotoxicidad en *P. microps* a través de la inhibición de AChE (Oliveira et al., 2012). Vieira et al. (2008) evaluaron los efectos de dos PAHs, particularmente de B[a]P y antraceno, y WAF en adultos de *P. microps*. Estos autores encontraron que todos los hidrocarburos evaluados inhibieron la actividad AChE en estos organismos. Estos resultados indicarían que la interrupción de la transmisión colinérgica por inhibición de AChE sería un mecanismo de neurotoxicidad en común entre estos químicos. Rodrigues et al. (2013) mostraron que la exposición a fluoranteno en el crustáceo *C. maenas* inhibió la actividad AChE, indicando efectos neurotóxicos. Todos estos trabajos muestran cómo la actividad EST es afectada por hidrocarburos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el mecanismo molecular de la inhibición de AChE por hidrocarburos continúa siendo desconocido.

Los estudios sobre biomarcadores de estrés oxidativo en invertebrados bentónicos pueden utilizarse para evaluar respuestas biológicas en relación a la presencia de contaminantes (Pauwels et al., 2013). En este sentido, la caracterización de biomarcadores en organismos nativos constituye un importante avance para que puedan ser aplicados adecuadamente en estudios ambientales locales.

La evaluación de cambios bioquímicos como biomarcadores resultan muy útiles debido a que las alteraciones moleculares son usualmente las primeras en detectarse, siendo indicadoras de exposición y efecto de un contaminante. El presente trabajo de tesis demostró que la exposición subletal a WAF induce importantes cambios en el sistema antioxidante y en las actividades enzimáticas en ambas poblaciones de anfípodos. Todos los marcadores medidos resultaron adecuados para su utilización como biomarcadores de exposición a hidrocarburos.

Conclusiones

7. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo de tesis señalan que la WAF, preparada con un petróleo de la región, se disipó completamente del medio acuoso después de 192 h. Los $t_{1/2}$ de cada uno de sus componentes variaron en un rango de 65 a 200 h. Si bien los compuestos presentes en la WAF mostraron altas tasas de disipación, aún manifestaron biodisponibilidad y toxicidad en los organismos.

La población de *H. curvispina* recolectada en LB presentó importantes diferencias en la toxicidad a WAF y en los niveles basales de actividad enzimática en relación a AD. Además, el análisis cualitativo de EST sugeriría una expresión diferencial de las isoformas y una baja actividad en anfípodos de AD, probablemente a causa de la inhibición por la exposición a TPHs u otro xenobiótico. La ocurrencia de una disminución en la susceptibilidad a WAF en los anfípodos de AD podría deberse a la adquisición de tolerancia, como resultado de la presión de selección con hidrocarburos tanto actual como pasada. Si bien no se determinaron BTEX ni PAHs en las muestras de este sitio, las concentraciones de TPHs fueron relevantes. Además, se observó en esta población un aumento significativo en las actividades basales de enzimas involucradas tanto en mecanismos antioxidantes como de detoxificación.

Por otro lado, la respuesta a la exposición a WAF fue diferente en ambas poblaciones. En anfípodos provenientes de LB, la exposición a una concentración subletal de WAF causó un incremento tanto del sistema antioxidante como en la actividad CYP450. Por el contrario, sólo alteró el contenido de GSH durante las primeras 6 h de exposición y la actividad CAT en la población de AD. Estos resultados sugieren que los mecanismos enzimáticos y no enzimáticos están involucrados en el sistema de defensa contra el estrés oxidativo generado por la WAF. Por lo tanto, uno de los mecanismos de toxicidad de la WAF en estos organismos podría ser a través de la inducción de estrés oxidativo celular. Los cambios bioquímicos observados en los organismos, como resultado de la exposición subletal a la WAF, podrían ser utilizados como biomarcadores potenciales de contaminación por petróleo. Además, constituirían una herramienta muy útil en los programas de monitoreo ambiental y evaluación de riesgos. En forma complementaria, la SSD permitió establecer niveles de referencia de toxicidad para WAF que podrían utilizarse como línea de base a nivel regional.

En la última década ha aumentado el interés en el uso de la expresión diferencial de genes como biomarcadores. Si bien, en este trabajo, se determinó sólo en forma cualitativa el

gen CYP450 en individuos controles y expuestos a WAF, se considera un avance importante para poder lograr cuantificar su expresión, y de esa forma, utilizarlo como biomarcador molecular de exposición a hidrocarburos.

Bibliografía

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.* 25, 107-123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>.
- Achuba, F.I., Osakwe, S.A., 2003. Petroleum-induced free radical toxicity in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiol. Biochem.* 29, 97-103.
- Akaishi, F.M., de Assis, H.C., Jakobi, S.C., Eiras-Stofella, D.R., St-Jean, S.D., Courtenay, S.C., Lima, E.F., Wagener, A.L., Scofield, A.L., Ribeiro, C.A., 2004. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46,244-53.
- Akbari, S., Law, A.T., Shariff, M., 2004. Toxicity of water soluble fractions of crude oil to fish, *Lutjanus argentimaculatus* and shrimp, *Penaeus monodon*. *Iran. J. Sci. Technol. Trans. A Sci.* 28, 169-175.
- Akintonwa, A., Ebere, A.G., 1990. Toxicity of Nigerian crude oil and chemical dispersants to *Barbus* sp. and *Clarias* sp. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 729-733. <https://doi.org/10.1007/BF01700993>.
- Almeda, R., Wambaugh, Z., Chai, C., Wang, Z., Liu, Z., Buskey, J.E., 2013. Effects of crude oil exposure on bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and survival of adult and larval stages of gelatinous zooplankton. *Plos One.* 8, 1-15.
- Amiard-Triquet, C., Rainbow Philip S, Roméo, M., 2011. *Tolerance to Environmental Contaminants*, first ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York.
- Amin, O.A., Comoglio, L., 2002. Toxicidad del petróleo diésel en el primer estadio larval de la centolla (*Lithodes santolla*) y del centollón (*Paralomis granulosa*). *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 37, 139-144.
- Anderson, J.W., Neff, J.M., Cox, B.A., Tatem, H.E., Hightower, G.M., 1974. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Mar. Biol.* 27, 75-88. <https://doi.org/10.1007/BF00394763>.
- Anguiano, O.L., Castro, C., Venturino, A., Ferrari, A., 2012. Acute toxicity and biochemical effects of azinphos methyl in the amphipod *Hyalella curvispina*. *Environ. Toxicol.* 29, 1043-1053. <https://doi.org/10.1002/tox.21834>.

- Anguiano, O.L., Ferrari, A., Soleño, I.J., Martínez, M.C., Venturino, A., Pechen de D'Angelo, A.M., Montagna, C.M., 2008. Enhanced esterase activity and resistance to azinphosmethyl in target and nontarget organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 2117–23. <https://doi.org/10.1897/07-655.1>.
- Anguiano, O.L., Vacca, M., Rodriguez Araujo, M.E., Montagna, M., Venturino A., Ferrari A., 2017. Acute toxicity and esterase response to carbaryl exposure in two different populations of amphipods *Hyaella curvispina*. *Aquat. Toxicol.* 188, 72-79.
- Arockiaraj, J., Gnanam, A.J., Palanisamy, R., Bhatt, P., Kumaresan, V., Chaurasia, M.K., Pasupuleti, M., Ramaswamy, H., Arasu, A., Sathyamoorthi, A., 2014. A cytosolic glutathione s-transferase, GST-theta from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: molecular and biochemical properties. *Gene.* 546, 437-442. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.05.063>.
- Arzuaga, X., Wassenberg, D., Di Giulio, R., Elskus, A., 2006. The chlorinated AHR ligand 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) promotes reactive oxygen species (ROS) production during embryonic development in the killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Aquat. Toxicol.* 76, 13-23.
- Asaikkutti, A., Saravana, B.P., Vimala K., Karthik, M., Cheruparambath, P., 2016. Effect of different levels dietary vitamin C on growth performance, muscle composition, antioxidant and enzyme activity of freshwater prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. *Aquacult. Rep.* 3, 229-236. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.04.002>.
- ASTM D2216, Standard Test Methods for Laboratory Determination of Water (Moisture) Content of Soil and Rock by Mass. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2010, www.astm.org.
- Atema, J., Stein, L.S., 1974. Effects of crude oil on the feeding behaviour of the lobster *Homarus Americanus*. *Environ. Pollut.* 6, 77-86. [https://doi.org/10.1016/0013-9327\(74\)90025-1](https://doi.org/10.1016/0013-9327(74)90025-1).
- Aurand, D.V., Coelho, G.M., 1996. Proceedings of the Fourth Meeting of the Chemical Response to Oil Spills: Ecological Effects Research Forum. Ecosystem Management & Associates, United States.
- Barnard, J.L., Karaman, G.S., 1991. The families and genera of marine gammaridean Amphipoda (except marine gammaroids), Part 1 and Part 2. Records of the Australian Museum, Sydney.

- Barron, M.G., Carls, M.G., Heintz, R., Rice, S.D., 2004. Evaluation of fish early life-stage toxicity models of chronic embryonic exposures to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Toxicol. Sci.* 78, 60-67. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh051>.
- Barron, M.G., Hemmer, M.J., Jackson, C.R., 2013. Development of aquatic toxicity benchmarks for oil products using species sensitivity distributions. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 9, 610–615. <https://doi.org/10.1002/ieam.1420>.
- Barron, M.G., Podrabsky, T., Ogle, R.S, Dugan, J.E., Ricker, R.W., 1999a. Sensitivity of the mysid *Mysidopsis bahia* to a weathered oil. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 62, 266-271.
- Barron, M.G., Podrabsky, T., Ogle, R.S., Dugan, J.E., Ricker, R.W., 1999b. Sensitivity of the sand crab *Emerita analoga* to a weathered oil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 469-475.
- Beers, R.F., Sizer, I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195, 133-140.
- Bellan-Santini, D., 1999. Ordre des Amphipodes (Amphipoda Latreille, 1816), en: Grassé, P.P. (Eds.), *Traité de Zoologie*, Tomo VII, Fascicule IIIA, Crustacés Pécararides. *Mémoires de l'Institut Océanographique* 19, Monaco, pp. 94-176.
- Bernard, A., Lauwerys, R., 1986. Present status and trends in biological monitoring of exposure to industrial chemicals. *J. Occup. Med.* 28, 558-562.
- Bhatt, L.R., Lacoul, P., Lekhak, H.D., Jha, P.K., 1999. Physicochemical characteristics and phytoplankton of Taudha Lake Kathmandu. *Poll. Res.* 14, 353-358.
- Bhattacharyya, S., Klerks, P.L., Nyman, J.A., 2003. Toxicity to freshwater organisms from oils and oil spill chemical treatments in laboratory microcosms. *Environ. Pollut.* 122, 205–215. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00294-4](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00294-4).
- Bocquené, G., Chantereau, S., Clérendeau, C., Beausir, E., Ménard, D., Raffin, B., Minier C., Burgeot T., Leszkowicz A.P., Narbonne, J-F., 2004. Biological effects of the “Erika” oil spill on the common mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat. Living Resour.* 17, 309-316. <https://doi.org/10.1051/alr:2004033>.
- Boese, B.L., Ozretich, R.J., Lamberson, J.O., Swartz, R.C., Cole, F.A., Pelletier, J., Jones, J., 1999. Toxicity and phototoxicity of mixtures of highly lipophilic PAH compounds in marine sediment: can the Σ model be extrapolated? *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 270-280.

- Borgmann, U., Grapentine, L., Norwood, W.P., Bird, G., Dixon, D.G., Lindeman, D., Chapman, P.M., Goulet, R.R., Wang, F., 2005. Sediment toxicity testing with the freshwater amphipod *Hyaella azteca*: relevance and application. *Chemosphere*. 61, 1740–1745. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.04.011>.
- Boudou, A., Ribeyre, F., 1997. Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environ. Health Perspect.* 105, 21-35.
- Bouvier, J.C., Boivin, T., Beslay, D., Sauphanor, B., 2002. Age-dependent response to insecticides and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 51, 55-66.
- Brandt, C.A., Becker, J.M., Porta, A., 2002. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and terrestrial biota after a spill of crude oil in Trecate, Italy. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1638-1643. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(2002\)021<1638:dopahi>2.0.co;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(2002)021<1638:dopahi>2.0.co;2).
- Brown, C.M., Reisfeld, B., Mayeno, A.N., 2008. Cytochromes P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates. *Drug Metab. Rev.* 40, 1-100. <https://doi.org/10.1080/03602530701836662>.
- Brown, K.E., King, C.K., Harrison, P.L., 2017. Lethal and behavioural impacts of diesels and fuel oil on the Antarctic amphipod *Paramoera walkeri*. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 2444-2455. <https://doi.org/10.1002/etc.3778>.
- Cantelmo, A., Lazell, R., Mantel, L., 1981. The effects of benzene on molting and limb regeneration in juvenile *Callinectes sapidus*. *Mar. Biol. Lett.* 2, 333-343.
- Capuzzo, J.M., Lancaster, B.A., 1981. Physiological effects of petroleum hydrocarbons on larval lobster (*Homarus americanus*): hydrocarbon accumulation and interference with lipid metabolism, en: Vernberg, J., Calabrese, A., Thurberg, F.P., Vernberg, W.B. (Eds.), *Biological Monitoring of Marine Pollutants*. Academic Press, New York, pp. 477-499.
- Carlson, E.A., Li, Y., Zelikoff, J.T., 2002. Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. *Aquat. Toxicol.* 56, 289–301.
- Carman, K.R., Fleeger, J.W., Pomarico, S.M., 1997. Response of a benthic food web to hydrocarbon contamination. *Limnol. Oceanogr.* 42, 561-571.
- Carman, K.R., Fleeger, J.W., Pomarico, S.M., 2000. Does historical exposure to hydrocarbon contamination alter the response of benthic communities to diesel contamination? *Mar. Environ. Res.* 49, 255-278.

- Carvalho, C.S., Bernusso, V.A., Selistre de Araújo, H.S., Gaeta Espíndola, E.L., Fernandes, M.N., 2012. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere*. 89, 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.013>.
- Cavalli, R.O., Tamtin, M., Lavens, P., Sorgeloos, P., Nelis, H.J., De Leenheer, A.P., 2001. The content of ascorbic acid and tocopherol in the tissues and eggs of wild *Macrobrachium rosenbergii* during maturation. *J. Shell fish Res.* 20, 939-943.
- Chambers, J.E., Boone, J.S., Carr, R.L., Chambers, H.W., Straus, D.L., 2002. Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 8, 165-176.
- Chang, H., 2008. Spatial analysis of water quality trends in the Han River Basin, South Korea. *Water Res.* 13, 3285-3304.
- Chapman, D., 1996. *Water Quality Assessments - A Guide to Use of Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring*, second ed. E&FN Spon, Great Britain.
- Chaty, S., Rodius, F., Vasseur, P., 2004. A comparative study of the expression of CYP1A and CYP4 genes in aquatic invertebrate (freshwater mussel, *Unio tumidus*) and vertebrate (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 69, 81-94.
- Chaurasia, M.K., Ravichandran, G., Nizam, F., Arasu, M.V., Al-Dhabi, N.A., Arshad, A., Harikrishnan, R., Arockiaraj, J., 2016. In-silico analysis and mRNA modulation of detoxification enzymes GST delta and kappa against various biotic and abiotic oxidative stressors. *Fish Shellfish Immun.* 54, 353-563. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.031>.
- Cheikyula, J.O., Koyama, J., Uno, S., 2008. Comparative study of bioconcentration and EROD activity induction in the japanese flounder, Red Sea Bream, and java medaka exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol.* 3, 354-362. <https://doi.org/10.1002/tox.20352>.
- Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Li, A.M.Y., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.*, 52, 189-203.
- Coelho, G.M., Aurand, D.V., 1997. *Proceedings of the Sixth Meeting of the Chemical Response to Oil Spills: Ecological Effects Research Forum*. Ecosystem Management & Associates, United States.

- Colbourne, J.K., Pfrender, M.E., Gilbert, D., Thomas, W.K., Tucker, A., Oakley, T.H., et al., 2011. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science*. 6017, 555-61. <https://doi.org/10.1126/science.1197761>.
- Conklin, D.E., 1997. Vitamins, en: D'Abramo, L.R. Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), *Crustacean nutrition*. World Aquaculture Society, United States, pp. 123-149.
- Coppock, R.W., Dziwenka, M.M., 2014. Biomarkers of petroleum products toxicity, en: Gupta, R.C. (Ed.), *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press, United States, pp. 647-654.
- Cormier, S.M., Daniel, F.B., 1994. Biomarkers: taking the science forward. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1011-1012.
- Crane, M., Newman, M.C., 2000. What level of effect is a no observed effect? *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 516-519. [https://doi.org/10.1897/15515028\(2000\)019<0516:wloeia>2.3.co;2](https://doi.org/10.1897/15515028(2000)019<0516:wloeia>2.3.co;2).
- Crowe, K.M., Newton, J.C., Kaltenboeck, B., Johnson, C., 2014. Oxidative stress responses of gulf killifish exposed to hydrocarbons from the Deepwater Horizon oil spill: potential implications for aquatic food resources. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 370-374. <https://doi.org/10.1002/etc.2427>.
- Crunkilton, R.L., Duchrow, R.M., 1990. Impact of a massive crude oil spill on the invertebrate fauna of a Missouri Ozark stream. *Environ. Pollut.* 63, 13-31. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(90\)90100-Q](https://doi.org/10.1016/0269-7491(90)90100-Q).
- Cucci, T.L., Epitafio, C.E., 1979. Long-term effects of water-soluble fractions of Kuwait crude oil on the larval and juvenile development of the mud crab *Eurypanopeus depressus*. *Mar. Biol.* 55, 215-220.
- Culbertson, J.B., Valiela, I., Peacock, E.E., Reddy, C.M., Carter, A., Vander Kruik, R., 2007. Long-term biological effects of petroleum residues on fiddler crabs in salt marshes. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 955-962. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.02.015>.
- Currie, Z., 2018. Assessing the toxicity of a petroleum-based hydraulic oil to aquatic organisms and the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in two amphibian species. A Thesis Submitted to the College of Graduate and Postdoctoral Studies in Partial Fulfillment of the Requirements For the Degree of Masters of Science in the Toxicology Graduate Program. University of Saskatchewan Saskatoon, Saskatchewan, Canada. 90 pp.

- Dalton, T.P., Puga, A., Shertzer, H.G., 2002. Induction of cellular oxidative stress by aryl hydrocarbon receptor activation. *Chem. Biol. Interact.* 141, 77-95.
- Das, A.K., 2000. Limno- chemistry of some Andhra Pradesh Reservoirs. *J. Inland Fish. Soc. India.* 32, 37-44.
- de Hoop, L., Schipper, A.M., Leuven, R.S., Huijbregts, M.A., Olsen, G.H., Smit, M.G., Hendriks, A.J., 2011. Sensitivity of polar and temperate marine organisms to oil components. *Environ. Sci. Technol.* 45, 9017-9023.
- Dembitsky, V.M., Rezanka, T., 1996. Comparative study of the endemic freshwater fauna of Lake Baikal-VII. Carotenoid composition of the deep-water amphipod crustacean *Acanthogammarus (Brachyropus) grewinkii*. *Comp. Biochem. Phys. B.* 114, 383-387.
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81-106.
- Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M., Guilhermino, L., 2003. Characterization of cholinesterases from *Daphnia magna* Straus and their inhibition by zinc. *B. Environ. Contam. Tox.* 71, 219-225.
- Dissanayake, A., Piggott, C., Baldwin, C., Sloman, K.A., 2010. Elucidating cellular and behavioural effects of contaminant impact (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) in both laboratory-exposed and field-collected shore crabs, *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda). *Mar. Environ. Res.* 70, 368-373.
- Dixon, D.R., Pruski, A.M., Dixon, L.R.J., Jha, A.N., 2002. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis.* 17, 495-507.
- Dong, X., Dan, Y., Wen-Hua, Y., Li-Gong, W., 2013. Algae mediate submerged macrophyte response to nutrient and dissolved inorganic carbon loading: a mesocosm study on different species. *Chemosphere.* 93, 1304-1308.
- Du, S., Hu, C., Cai, S., Shen, Q., Zheng, S., 2006. Effect of different levels of dietary atocopherol on ovarian maturation and reproductive performance of broodstock *Litopenaeus vannamei* (Boone). *J. Shellfish Res.* 25, 589-593. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2006\)25\[589:EODLOD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2006)25[589:EODLOD]2.0.CO;2).
- Dupuis, A., Ucan-Marin, F., 2015. A literature review on the aquatic toxicology of petroleum oil: an overview of oil properties and effects to aquatic biota. *Can. Sci. Advis. Sec. Res. Doc.* 2015/007. 52 pp.
- ECOFRAM, 1999. Ecological Committee on FIFRA risk assessment methods: Report of the Aquatic Workgroup. Washington, DC.

- Edema, N., 2012. Effects of crude oil contaminated water on the environment, en: Manar, E-S.A-R. (Ed.), Crude Oil Emulsions Composition Stability and Characterization. InTech, Europe, pp. 169-180.
- Ekanem, A.P., Asuquo, F.E., Ndick, E.J., 2011. Toxicity of crude oil to fresh water shrimp, *Macrobrachium macrobrachion* and *Macrobrachium vollehovenii* from Nigerian coastal water. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 86, 394-397. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0229-8>.
- Elia, A.C., Anastasi, V., Dörr, A.J., 2006. Hepatic antioxidant enzymes and total glutathione of *Cyprinus carpio* exposed to three disinfectants, chlorine dioxide, sodium hypochlorite and peracetic acid, for superficial water potabilization. Chemosphere. 64, 1633-1641. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.035>.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77.
- EPA, 2000. Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, second ed. National Service Center for Environmental Publications, Washington.
- EPA, 2007. Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, Chapter 12th LAND TREATMENT MONITORING. <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/chap12.pdf>.
- EPA, 2017. ECOTOX User Guide: ECOTOXicology Knowledgebase System. Version 4.0. <http://www.epa.gov/ecotox/> (acceso marzo2017).
- Faksness, L.G., Brandvik, P.J., Sydnes, L.K., 2008. Composition of the water accommodated fractions as a function of exposure times and temperatures. Mar. Pollut. Bull. 56, 1746-1754. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.07.001>.
- Fang, X., Thornton, C., Scheffler, B.E., Willett, K.L., 2013. Benzo[a]pyrene decreases global and gene specific DNA methylation during zebrafish development. Environ. Toxicol. Pharmacol. 36, 40-50. <http://doi.org/10.1016/j.etap.2013.02.014>.
- Fanjul-Mole, M.L., Gonsbatt, M.E., 2012. Oxidative stress and antioxidant systems in crustacean life cycles, in: Abele, D., Vázquez-Medina, J.P., Zenteno-Savín, T. (Eds.), Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems, first ed. Wiley-Blackwell, United Kingdom, pp. 208-223.
- Fernández-Gimenez, A.V., Pereira, N.d.l.Á., Sarasa, M.V., 2016. Liposoluble vitamins in crustacean feed: metabolic and histological responses. Indian J. Exp. Biol. 54, 297-308.

- Ferrando, A., Gonzalez, E., Franco, M., Commendatore, M., Nievas, M., Militon, C., Stora, G., Gilbert, F., Esteves, J.L., Cuny, P., 2015. Oil spill effects on macrofaunal communities and bioturbation of pristine marine sediments (Caleta Valdés, Patagonia, Argentina): experimental evidence of low resistance capacities of benthic systems without history of pollution. *Environ. Sci. Pollut. R.* 22, 15294-15306.
- Fingas, M., 2015. Oil and petroleum evaporation, en: Fingas, M. (Ed.), *Handbook of Oil Spill Science and Technology*. Wiley & Sons Inc., New Jersey, pp. 207-224.
- Fingas, M., Fieldhouse, B., 2015. Water-in-oil emulsions: formation and prediction, en: Fingas, M. (Ed.), *Handbook of Oil Spill Science and Technology*. Wiley & Sons Inc., New Jersey, pp. 225-270.
- Fleeger, J.W., Carman, K.R., Nisbet, R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 317, 207-233. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00141-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00141-4).
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294-299.
- Fondriest Environmental Inc. (FEI), 2014. Conductivity, salinity and total dissolved solids: fundamentals of environmental measurements. <http://www.fondriest.com/environmentalmeasurements/parameters/water-quality/conductivity-salinity-tds/> (acceso 2016).
- Fossi, M.C., Lari, L., Casini, S., Mattei, N., Savelli, C., Sanchez-Hernandez, J.C., Castellani, S., Depledge, M., Bamber, S., Walker, C., Savva, D., Sparagano, O., 1996. Biochemical and genotoxic biomarkers in the Mediterranean crab *Carcinus aestuarii* experimentally exposed to polychlorobiphenyls, benzopyrene and methylmercury. *Mar. Environ. Res.* 42, 29-32, [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(95\)00059-3](https://doi.org/10.1016/0141-1136(95)00059-3).
- Gaillard, M., Juillet, C., Cézilly, F., Perrot-Minnot, M.J., 2004. Carotenoids of two freshwater amphipod species (*Gammarus pulex* and *G. roeseli*) and their common acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 139, 129-136.
- Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2001. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicol.* 10, 5-23.

- García, R., Ayala, P.A., Perdomo, S.P., 2012. Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Rev. Cienc. Salud*; 10, 59-71.
- Gil, F., Pla, A., 2001. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *J. Appl. Toxicol.* 21, 245-255.
- Gismondi, E., Beisel, J.N., Cossu-Leguille, C., 2012. Influence of gender and season on reduced glutathione concentration and energy reserves of *Gammarus roeseli*. *Environ. Res.* 118, 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2012.06.004>.
- Giusto, A., Somma, L.A., Ferrari, L., 2012. Cadmium toxicity assessment in juveniles of the Austral South America amphipod *Hyaella curvispina*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 79, 163-169. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.12.020>.
- Grosso, L.E., Peralta, M., 1999. Anfípodos de agua dulce Sudamericanos. Revisión del género *Hyaella Schmitt*. *Acta Zool. Lilloana.* 45, 79-98.
- Gulec, I., Leonard, B., Holdway, D.A., 1997. Oil and dispersed oil toxicity to amphipods and snails. *Spill Sci. Technol. B.* 4, 1-6. [https://doi.org/10.1016/s1353-2561\(97\)00003-0](https://doi.org/10.1016/s1353-2561(97)00003-0).
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Hall, A.T., Oris, J.T., 1991. Anthracene reduces reproductive potential and is maternally transferred during long-term exposure in fathead minnows. *Aquat. Toxicol.* 19, 249-264.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Bio. Med.* 18, 125-126. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)91457-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)91457-3).
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2006. *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Clarendon Press, Oxford.
- Han, J., Won, E.J., Hwang, D.S., Shin, K.H., Lee, Y.S., Leung, K.M., Lee, S.J., Lee, J.S., 2014. Crude oil exposure results in oxidative stress-mediated dysfunctional development and reproduction in the copepod *Tigriopus japonicus* and modulates expression of cytochrome P450 (CYP) genes. *Aquat. Toxicol.* 152, 308-317. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.04.027>.
- Hanazato, T., 2001. Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environ. Pollut.* 112, 1-10.

- Hasselberg, L., Meier, S., Svardal, A., 2004. Effects of alkylphenols on redox status in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquat. Toxicol.* 69, 95-105.
- Heras, H., Ackman, R.G., Macpherson, E.J., 1992. Tainting of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by petroleum hydrocarbons during a short term exposure. *Mar. Pollut. Bull.* 24, 310-315.
- Heras, H., Zhou, S., Ackman, R.G., 1995. Plastic bags for stable storage of the water-soluble fraction of crude petroleum used in aquatic environment toxicity and tainting studies. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 597-602.
- Ho, K., Patton, L., Latimer, J.S., Pruell, R.J., Pelletier, M., McKinney, R., Jayaraman, S., 1999. The chemistry and toxicity of sediment affected by oil from the North Cape spilled into Rhode Island Sound. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 314-323. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(98\)00151-9](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(98)00151-9).
- Honkakoski, P., Negishi, M., 2000. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem. J.* 347, 321-337.
- Hughes, E.M., Gallagher, E.P., 2004. Effects of 17-[beta] estradiol and 4-nonylphenol on phase II electrophilic detoxification pathways in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 137, 237-247.
- Ikenaka, Y., Eun, H., Ishizaka, M., Miyabara, Y., 2006. Metabolism of pyrene by aquatic crustacean, *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 80, 158-165. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.08.005>.
- Ikenaka, Y., Sakamoto, M., Nagata, T., Takahashi, H., Miyabara, Y., Hanazato, T., Ishizuka, M., Isobe, T., Kim, J-W., Chang, K-H., 2013. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on an aquatic ecosystem: acute toxicity and community-level toxic impact tests of benzo[a]pyrene using lake zooplankton community. *J. Toxicol Sci.* 38, 131-136.
- Informe anual de hidrocarburos año 2017, 2018. IAE, Instituto Argentino de Energía “Gral. Mosconi”. <http://web.iae.org.ar/wp-content/uploads/2018/02/Informe-anual-de-hidrocarburos-2017-IAE-Mosconi-.pdf> (acceso junio 2018).
- Ingersoll, C.G., 1995. Sediment test, en: Rand, G.M. (Ed.), *Fundamental of aquatic toxicology*. Taylor & Francis, Washinton, pp. 231-255.
- Irwin, R.J., Van Mouwerik, M.V., Stevens, L., Seese, M.D., Basham, W., 1998. *Environmental contaminants encyclopedia*: Fort Collins, Colo., National Park Service, Water Resources Division.

- James, M.O., Boyle, S.M., 1998. Review cytochromes P450 in crustacean. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 121, 157-172.
- Jergentz, S., Pessacq, P., Mugni, H., Bonetto, C., Schulz, R., 2004. Linking in situ bioassays and population dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.007>.
- Johnson, R., Gretchen, S., Richard, S., 2007. Earth Science with Vernier. Vernier Software & Technology, Oregon.
- Josephy, P.D., Guengerich, F.P., Miners, J.O., 2005. "Phase I and Phase II" drug metabolism: terminology that we should phase out? *Drug Metab. Rev.* 37, 575-580.
- Jung, D., Di Giulio, R.T., 2010. Identification of mitochondrial cytochrome P450 induced in response to polycyclic aromatic hydrocarbons in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 151, 107-112. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.09.003>.
- Kelly, K.L., Taylor, C.M., 2018. Effects of crude oil on survival and development in embryonated eggs in *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Decapoda, Portunidae) *Peer J. Preprints.* 6, 1-27. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.26750v1>.
- Kim, M., Ahn, I.Y., Cheonand, J., Park, H., 2009. Molecular cloning and thermal stress induced expression of a pi-class glutathione S-transferase (GST) in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Comp. Biochem. Phys. A.* 152, 207-213.
- Klerks, P.L., Weis, J.S., 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environ. Pollut.* 45, 173-205. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(87\)90057-1](https://doi.org/10.1016/0269-7491(87)90057-1).
- Landers, J.P., Bunce, N.J., 1991. The Ah-receptor and the mechanism of dioxin toxicity. *Biochem. J.* 276, 273-287.
- Landis, W.G., Yu, M-H., 2004. Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems, third ed. CRC Press, United States.
- Laughlin, R.B., Young, L.G.L., Neff, J.M., 1978. A long-term study of the effects of water-soluble fractions of No. 2 fuel oil on the survival, development rate, and growth of the mud crab *Rhithropanopeus harrisi*. *Mar. Biol.* 47, 87-95. <https://doi.org/10.1007/BF00397022>.
- Lavariás, S., Heras, H., Pedrini, N., Tournier, H., Ansaldo, M., 2011. Antioxidant response and oxidative stress levels in *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae) exposed to the water-soluble fraction of petroleum. *Comp.*

- Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 153, 415-421.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.02.002>.
- Lavarías, S., Heras, H., Pollero, R.J., 2004. Toxicity, uptake, and release of the water-soluble fraction of crude oil in different developing stages of the prawn *Macrobrachium borellii*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 47, 215-222.
<https://doi.org/10.1007/s00244-004-3025-1>.
- Law, E.A., 1993. Aquatic pollution: An introductory text, second ed. Wiley, New York.
- Lee, J-S., Lee, K-T., Park, G.S., 2005. Acute toxicity of heavy metals, tributyltin, ammonia and polycyclic aromatic hydrocarbons to benthic amphipod *Grandidierella japonica*. Ocean Sci. 40, 61-66.
<https://doi.org/10.1007/BF03028586>.
- Lee, K.W., Raisuddin, S., Rhee, J.S., Hwang, D.S., Yu, I.T., Lee, Y.M., Park, H.G., Lee, J.S., 2008. Expression of glutathione S-transferase (GST) genes in the marine copepod *Tigriopus japonicus* exposed to trace metals. Aquat. Toxicol. 89, 158-66.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.06.011>.
- Leggieri, L.R., De Anna, J., Cerón, G.A., Arias Darraz, L., Fuentes Monasterio, D., Carcamo, J., Luquet, C., 2017. Cyps molecular biomarkers in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to assess oil contamination in a patagonian stream. Rev. Int. Contam. Ambie. 4, 681-690. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.04.11>.
- Lewis, C., Watson, G.J., 2012. Expanding the ecotoxicological toolbox: the inclusion of polychaete reproductive endpoints. Mar. Environ. Res. 75, 10-22.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.08.002>.
- Li, B., Bisgaard, H.C., Forbes, V.E., 2004. Identification and expression of two novel cytochrome P450 genes, belonging to CYP4 and a new CYP331 family, in the polychaete *Capitella capitata* sp. I. Biochem. Biophys. Res. Commun. 325, 510-517.
- Li, C-L.J., James, M.O., 1993. Glucose and sulfate conjugations of phenol, β -naphthol and 3-hydroxybenzo[a]pyrene by the American lobster (*Homarus americanus*). Aquat. Toxicol. 26, 57-71. [https://doi.org/10.1016/0166-445x\(93\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0166-445x(93)90005-1).
- Lima, A.V.B., Guerra, A.L., de Almeida, E.A., Taddei, F.G., Castiglioni, L., 2013. Characterization of esterase patterns in hepatopancreas of three species of *Macrobrachium* (Palaemonidae). Biochem. Syst. Ecol. 47, 132-138.
- Lindberg, C.D., Jayasundara, N., Kozal, J.S., Leuthner, T.C., Di Giulio, R.T., 2017. Resistance to polycyclic aromatic hydrocarbon toxicity and associated bioenergetic

- consequences in a population of *Fundulus heteroclitus*. *Ecotoxicology*. 26, 435-448. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1775-6>.
- Liu, H.P., Chen, F.Y., Gopalakrishnan, S., Qiao, K., Bo, J., Wang, K.J., 2010. Antioxidant enzymes from the crab *Scylla paramamosain*: gene cloning and gene/protein expression profiles against LPS challenge. *Fish Shellfish Immun.* 28, 862-871.
- Livingstone, D.R., Lips, F., Garcia Martinez, P., Pipe, R.K., 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 112, 265-276.
- Long, E.R., Macdonald, D.D., Smith, S.L., Calder, F.D., 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ. Manage.* 19, 81–97. <https://doi.org/10.1007/BF02472006>.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lucas, J., Percelay, I., Larcher, T., Lefrancois, C., 2016. Effects of pyrolytic and petrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons on swimming and metabolic performance of zebrafish contaminated by ingestion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 132, 145-152.
- Maccarone, A.D., Brzorad J.N., 1995. Effects of an oil spill on the prey populations and foraging behavior of breeding wading birds. *Wetlands.* 15, 397-407.
- MADEP - Massachusetts Department of Environmental Protection State Agency, 2004. Method for the Determination of Extractable Petroleum Hydrocarbons (EPH). Boston, Massachusetts.
- Maher, W.A., 1986. Preparation of water soluble fractions of crude oils for toxicity studies. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 226-229.
- Martínez-Gómez, C., Fernández, B., Valdés, J., Campillo, J.A., Benedicto, J., Sánchez, F., Vethaak, A.D., 2009. Evaluation of three-year monitoring with biomarkers in fish following the Prestige oil spill (N Spain). *Chemosphere.* 74, 613-620. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.052>.
- Martínez-Jerónimo, F., Villaseñor, R., Ríos, G., Espinosa-Chavez, F., 2005. Toxicity of the crude oil water-soluble fraction and kaolin-adsorbed crude oil on *Daphnia magna* (Crustacea: Anomopoda). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 444-449. <https://doi.org/10.1007/s00244-003-0220-4>.
- Matés, J.M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology.* 153, 83-104.

- Mayer, F.L., Ellersieck, M.R., 1986. Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals. Fish and Wildlife Service, Washington.
- McLachlan, M.S., Czub, G., Wania, F., 2002. The influence of vertical sorbed phase transport on the fate of organic chemicals in surface soils. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4860–4867. <https://doi.org/10.1021/es025662y>.
- Meador, J.P., Stein, J.E., Reichert, W.L., Varanasi, U., 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 143, 79-165.
- Meunier, B., de Visser, S.P., Shaik, S., 2004. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem Rev.* 104, 3947-3980.
- Milinkovitch, T., Godefroy, J., Théron, M., Thomas-Guyon, H., 2011. Toxicity of dispersant application: biomarkers responses in gills of juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*). *Environ. Pollut.* 159, 2921-2928. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.035>.
- Ministerio de Hacienda, Secretaría de Hacienda, Dirección Nacional de Asuntos Provinciales, 2018. Informe sintético de caracterización socio-productiva. Provincia de Neuquén. <http://www2.mecon.gov.ar/hacienda/dinrep/Informes/archivos/neuquen.pdf> (acceso junio 2018).
- Mirbahai, L., Williams, T.D., Zhan, H., Gong, Z., Chipman, J.K., 2011. Comprehensive profiling of zebrafish hepatic proximal promoter CpG island methylation and its modification during chemical carcinogenesis. *BMC Genomics.* 12, 1-16. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-3>.
- Moles, A., Rice, S.D., Korn, S., 1979. Sensitivity of alaskan freshwater and anadromous fishes to Prudhoe Bay crude oil and benzene. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 108, 408-414. 10.1577/1548-8659(1979)108<408:SOAFAA>2.0.CO;2.
- Monza, L.B., 2009. Origen y distribución de hidrocarburos alifáticos en sedimentos de los ríos Limay y Neuquén. Tesis para optar al grado de maestría en Ciencias Químicas. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue. 189 pp.
- Monza, L.B., Loewy, R.M., Savini, M.C., Pechen de d'Angelo, A.M., 2013. Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in sediments from the Neuquen River, Argentine Patagonia. *J. Environ. Sci. Heal. Part A*

- Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng. 48, 370-9.
<https://doi.org/10.1080/10934529.2013.728097>.
- Morton, B., Wu, R.S., 1977. The toxic effects of hydrocarbons upon the naupliar and adult stages of *Balanus* (Crustacea: Cirripedia). *Mar. Pollut. Bull.* 8, 232-236.
- Müller, H., 1987. Hydrocarbons in the freshwater environment: a literature review. *Arch. Hydrobiol. Adv. Limnol.* 24, 1-69.
- Murado, M.A., Prieto, M.A., 2013. NOEC and LOEC as merely concessive expedients: two unambiguous alternatives and some criteria to maximize the efficiency of dose-response experimental designs. *Sci. Total Environ.* 461-462, 576-586.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.098>.
- Mustafa, Y.M., El-Naggar, A.Y., El-Fadly, A.M., Ebiad, M.A., Ibrahim, E.S., 2014. *Petroleum in View of its Classification, Assay and Analysis*. International E-Publication, India.
- Mustapha, M.K., Omotosho, J.S., 2005. An assessment of the physico-chemical properties of Moro Lake, Kwara State, Nigeria. *African J. App. Zoo. Env. Biol.* 7, 3-7.
- Nannelli, A., Rossignolo, F., Tolando, R., Rossato, P., 2009. Effect of β -naphthoflavone on AhR-regulated genes (CYP1A1, 1A2, 1B1, 2S1, Nrf2, and GST) and antioxidant enzymes in various brain regions of pig. *Toxicol.* 265, 69-79.
- Neff, J.M., Ostazeski, S., Gardiner, W., Stejskal, I., 2000. Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1809-1821. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(2000\)019<1809:EOWOTT>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(2000)019<1809:EOWOTT>2.3.CO;2).
- Newman, M.C., 2015. *Fundamentals of Ecotoxicology: The Science of Pollution*, fourth ed. CRC Press, New York.
- Nguyen, B.T., Koshio, S., Sakiyama, K., Harakawa, S., Gao, J., Mamauag, R.E., Ishikawa, M., Yokoyama, S., 2012. Effects of dietary vitamins C and E and their interactions on reproductive performance, larval quality and tissue vitamin contents in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* Bate. *Aquaculture.* 334-337, 73-81.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.11.044>.
- Nikinmaa, M., 2014. *An Introduction to Aquatic Toxicology*. Elsevier, USA.
- NIVA, Norwegian Institute for Water Research., 2006. *Biomarkers in monitoring: A review*. NIVA, Oslo.

- North, M., Vulpe, C.D., 2010. Functional toxicogenomics: mechanism-centered toxicology. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 4796-4813
- NRC (National Research Council), 2003. *Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects*. National Academies Press, Washington.
- Oberdörster, E., Brouwer, M., Hoexum-Brouwer, T., Manning, S., McLachlan, J.A., 2000. Long-term pyrene exposure of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, affects molting and reproduction of exposed males and offspring of exposed females. *Environ. Health Perspect.* 108, 641-646.
- Oliveira, M., Gravato, C., Guilhermino, L., 2012. Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae): mortality, biomarkers and swimming performance. *Ecol. Indic.* 19, 206-214. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.08.006>.
- Omaka, O.N., Nwabue, F.I., Itumoh, E.J., Oroke, E.C., Igwe, D.O., 2014. Physicochemical parameters and nutrient variation of streams and rivers in Abakaliki, Ebonyl State, Nigeria. *Global Nest J.* 16, 114-123.
- Omura, T., 2006. Mitochondrial P450s. *Chem. Biol. Interact.* 163, 86-93.
- Pacheco, M., Santos, M.A., 2001. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 64-75.
- Pangrekar, J., Kole, P.L., Honey, S.A., Kumar, S., Sikka, H.C., 2003. Metabolism of chrysene by brown bullhead liver microsomes. *Toxicol. Sci.* 71, 67-73.
- Parkinson, A., Ogilvie, B.W., 2008. Biotransformations of xenobiotics, en: Klaassen, C.D., Watkins III, J.B. (Eds.), *Casarett & Doull's Essentials of Toxicology*, second ed. McGraw-Hill, New York, pp. 133-224.
- Pauwels, M., Frérot, H., Souleman, D., Vandenbulcke, F., 2013. Using biomarkers in an evolutionary context: lessons from the analysis of biological responses of Oligochaete annelids to metal exposure. *Environ. Pollut.* 179, 343-350. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.005>.
- Pearce, G.R., Chaudhry, M.R., Ghulum, S., 1999. *A simple methodology for water quality monitoring*. HR Wallingford Group Ltd., United Kingdom.
- Peluso, L., Giusto, A., Bulus Rossini, G.D., Ferrari, L., Salibián, A., Ronco, A.E., 2011. *Hyalella curvispina* (amphipoda) as a test organism in laboratory toxicity testing of environmental samples. *Fresen. Environ. Bull.* 20, 372-376.

- Petrulis, J.R., Bunce, N.J., 2000. Competitive behavior in the interactive toxicology of halogenated aromatic compounds. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14, 73-81.
- Pollino, C.A., Holdway, D.A., 2002. Toxicity testing of crude oil and related compounds using early life stages of the crimson-spotted rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52, 180-189.
- Prieto Díaz, V.I., Martínez de Villa Pérez, A., 1999. La contaminación de las aguas por hidrocarburos: un enfoque para abordar su estudio. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* 37, 13-20.
- Rewitz, K., Styrislave, B., Andersen O., 2003. CYP330A1 and CYP4C39 enzymes in the shore crab *Carcinus maenas*: sequence and expression regulation by ecdysteroids and xenobiotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 252-260.
- Rhee, J.S., Kim, B.M., Choi, B.S., Choi, I.Y., Wu, R.S., Nelson, D.R., Lee, J.S., 2013. Whole spectrum of cytochrome P450 genes and molecular responses to water-accommodated fractions exposure in the marine medaka. *Environ. Sci. Technol.* 47, 4804-4812. <https://doi.org/10.1021/es400186r>.
- Rielley, G., Collier, R.J., Jones, D.M., Eglinton, G., 1991. The biogeochemistry of Ellesmere Lake, U.K.-I: source correlation of leaf wax inputs to the sedimentary lipid record. *Org. Geochem.* 17, 901-912. [https://doi.org/10.1016/0146-6380\(91\)90031-E](https://doi.org/10.1016/0146-6380(91)90031-E).
- Rodrigues, A.P., Lehtonen, K.K., Guilhermino, L., Guimarães, L., 2013. Exposure of *Carcinus maenas* to waterborne fluoranthene: accumulation and multibiomarker responses. *Sci. Total Environ.* 443, 454-463.
- Rodrigues, R.V., Miranda-Filho, K.C., Gusmão, E.P., Moreira, C.B., Romano, L.A., Sampaio, L.A., 2010. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Sci. Total Environ.* 408, 2054-2059. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.01.063>.
- Roncalli, V., Cieslak, M.C., Passamanek, Y., Christie, A.E., Lenz, P.H., 2015. Glutathione S-transferase (GST) gene diversity in the crustacean *Calanus finmarchicus* – contributors to cellular detoxification. *Plos One.* 10, 1-27. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0123322>.
- Rosenbaum, E.A., Duboscq, L., Soleño, J., Montagna, C.M., Ferrari, A., Venturino, A., 2012. Response of biomarkers in amphibian larvae to in situ exposures in a fruit-producing region in North Patagonia, Argentina. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 2311-2317.

- Rudolph, A., Yañez, R., Troncoso, L., 2001. Effects of exposure of *Oncorhynchus mykiss* to the water-accommodated fraction of petroleum hydrocarbons. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 400-406. <https://doi.org/10.1007/s00128-001-0019-9>.
- Sakari, M., Zakaria, M.P., Junos, M.B., Annuar, N.A., Yun, H.Y., Heng, Y.S., Syed Zainuddin, S.M.H., Chai, K.L., 2008. Spatial distribution of petroleum hydrocarbon in sediments of major rivers from east coast of peninsular Malaysia. *Coast. Mar. Sci.* 32, 9-18.
- Sami, S., Faisal, M., Huggett, R.J., 1993. Effects of laboratory exposure to sediments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons on the hemocytes of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* 35, 131-135.
- Sammarco, P.W., Kolian, S.R., Warby, R.A.F., Bouldin, J.L., Subra, W.A., Porter, S.A., 2013. Distribution and concentrations of petroleum hydrocarbons associated with the BP/Deepwater horizon oil spill, Gulf of Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 73, 129-143. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.05.029>.
- Sánchez, M.L., Asurmendi, E., Armas, P., 2013. Subgrupo Río Colorado (Grupo Neuquén): registros de paleosismicidad en la cuenca de antepaís andina, cuenca Neuquina, provincias de Neuquén y Río Negro. *Rev. Asoc. Geol. Argent.* 70, 96-114.
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000448222013000100007&lng=es&tlng=es.
- Sandrini-Neto, L., Pereira, L., Martins, C.C., Silva de Assis, H.C., Camus, L., Lana, P.C., 2016. Antioxidant responses in estuarine invertebrates exposed to repeated oil spills: effects of frequency and dosage in a field manipulative experiment. *Aquat. Toxicol.* 177, 237-249. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.05.028>.
- Sarojini, R., Nagabhushanam, R., Fingerman, M., 1995. Naphthlene-induced atresia in the ovary of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31, 76-83.
- Scandalios, J.G., 2002. The rise of ROS. *Trends Biochem. Sci.* 27, 483-486.
- Scandalios, J.G., 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 995-1014.
- Scarlett, A., Dissanayake, A., Rowland, S., Galloway, T.S., 2009. Behavioural, physiological and cellular responses following trophic transfer of toxic monoaromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 381-387.

- Schäfer, R.B., van den Brink P.J., Liess, M., 2011. Impacts of pesticides on freshwater ecosystems, en: Sánchez-Bayo, F., van den Brink, P.J., Mann, R.M. (Eds.), Ecological Impacts of Toxic Chemicals. Bentham Science Publishers, United States, pp. 111-137.
- Secretaría de Estado de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la Provincia de Neuquén, 2013. <http://w2.neuquen.gov.ar/>, Artíc (acceso noviembre 2013).
- SETAC, 1994. Aquatic dialogue group: pesticide risk assessment and mitigation. Society for Environmental Toxicology and Chemistry and SETAC Foundation for Environmental Education. Editorial Reviews, Florida.
- Sheehan, D., Foley, D.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 360, 1-16.
- Shiau, S-Y., 2001. Vitamin C requirement in crustaceans, en: Dabrowski, K. (Ed.), Ascorbic Acid In Aquatic Organisms Status and Perspectives. CRC Press, Washington, pp. 87-96.
- Sies, H., 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215, 213-219.
- Sies, H., 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 916-921.
- Simonato, J.D., Guedes, C.L., Martinez, C.B., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 112-120. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.01.012>.
- Singer, M.M., Aurand, D., Bragins, G.E., Clark, J.R., Coelho, G.M., Sowby, M.L., Tjeerdema, R.S., 2000. Standardization of the preparation and quantitation of water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 1007-1016.
- Smit, M.G., Bechmann, R.K., Hendriks, A.J., Skadsheim, A., Larsen, B.K., Baussant, T., Bamber, S., Sanni, S., 2009. Relating biomarkers to whole-organism effects using species sensitivity distributions: a pilot study for marine species exposed to oil. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 1104-1109.
- Smith, P., Snook, D., Muscutt, A., Smit, A., 2010. Effects of a diesel spill on freshwater macroinvertebrates in two urban watercourses. *Water Environ. J.* 24, 249-260.
- Smreczak, B., Maliszewska-Kordybach, B., Klimkowicz-Pawlas, A., 2008. Assessing the bioavailability of phenanthrene to soil microorganisms using the Tenax extraction

- method. Environ. Geochem. Health 30, 183-186. <https://doi.org/10.1007/s10653-008-9141-5>.
- Song, S.B., Xu, Y., Zhou, B.S., 2006. Effects of hexachlorobenzene on antioxidant status of liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*). Chemosphere. 65, 699-706. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.033>.
- Speight, J.G., 1991. The Chemistry and Technology of Petroleum, second ed. Marcel Dekker, New York.
- Springer, M., 2010. Biomonitoring acuático. Rev. Biol. Trop. 58, 53-59.
- Stara, A., Machova, J., Velisek, J., 2012. Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Environ. Toxicol. Pharmacol. 33, 334-343. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.12.019>.
- Țigănuș, D., Coatu, V., Lazăr, L., Oros, A., 2016. Present level of petroleum hydrocarbons in seawater associated with offshore exploration activities from the Romanian black sea sector. Cercetări marine: Recherches marines. 46, 98-108.
- Tintos, A., Gesto, M., Míguez, J.M., Soengas, J.L., 2007. Naphthalene treatment alters liver intermediary metabolism and levels of steroid hormones in plasma of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 66, 139-147.
- Uguz, C., Iscan, M., Ergüven, A., Isgor, B., Togan, I., 2003. The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effect on the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Res. 92, 262-70. [https://doi.org/10.1016/s0013-9351\(03\)00033-1](https://doi.org/10.1016/s0013-9351(03)00033-1).
- UNEPGEMS (United Nations Environment Programme Global Environment Monitoring System/Water Programme), 2008. Water Quality for Ecosystem and Human Health, second ed. Drukarnia MiW, Canada.
- Ullrich, S.O., Millemann, R.E., 1983. Survival, respiration, and food assimilation of *Daphnia magna* exposed to petroleum- and coal-derived oils at three temperatures. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 40, 17-26. <https://doi.org/10.1139/f83-004>.
- U.S. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2015. Toxicological Profile for Toluene - Draft.
- Usharani, K., Umarani, K., Ayyasamy, P.M., Shanthi, K., Lakshmanaperumalsamy, P., 2010. Physico-chemical and bacteriological characteristics of Noyyal River and ground water quality of Perur, India. J. Appl. Sci. Environ. Manage. 14, 29-35.

- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
- Vandegheuchte, M.B., Janssen, C.R., 2014. Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 764-765, 36-45. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.08.008>.
- Vasanth, S., Ganesh, A., Siva Vijayakumar, T., Karthikeyeni, S., Manimegalai, M., Subramanian, P., 2012. Assessment of anthracene on hepatic and antioxidant enzyme activities in *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Int. J. Pharm. Life Sci.* 3, 1696-1704.
- Vazquez, L., Alpuche, J., Maldonado, G., Agundis, C., Pereyra-Morales, A., Zenteno, E., 2009. Review: immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immun.* 3, 179-88. <https://doi.org/10.1177/1753425909102876>.
- Vellinger, C., Gismondi, E., Felten, V., Rousselle, P., Mehennaoui, K., Parant, M., Usseglio-Polatera, P., 2013. Single and combined effects of cadmium and arsenate in *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda): understanding the links between physiological and behavioural responses. *Aquat. Toxicol.* 140-141, 106-116. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.05.010>.
- Venturino, A., Gauna, L.E., Bergoc, R.M., Pechen de D'Angelo, A.M., 1992. Effect of exogenously applied polyamines on malathion toxicity in the toad *Bufo arenarum* Hensel. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 135-9.
- Verlecar, X.N., Jena, K.B., Chainy, G.B.N., 2008. Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 76, 745-752. <http://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.08.002>.
- Vieira, L.R., Sousa, A., Frasco, M.F., Lima, I., Morgado, F., Guilhermino, L., 2008. Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Sci. Total Environ.* 395, 87-100. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.01.052>.
- Vonlanthen, P., Bittner, D., Hudson, A.G., Young, K.A., Müller, R., Lundsgaard-Hansen, B., Roy, D., Di Piazza, S., Largiader, C.R., Seehausen, O., 2012. Eutrophication causes speciation reversal in whitefish adaptive radiations. *Nature.* 482, 357-362. <https://doi.org/10.1038/nature10824>.

- Walkley, A., Black, I.A., 1934. An examination of Degtjareff method for determining organic carbon in soils: effect of variation in digestion condition and inorganic soil constituents. *Soil Sci.* 63, 251-263. <https://doi.org/10.1097/00010694-194704000-00001>.
- Wang, S.Y., Stickle, W.B., 1987. Bioenergetics, growth and molting of the blue crab, *Callinectes sapidus*, exposed to the water-soluble fraction of South Louisiana crude oil, en: Vernberg, W.B., Calabrese, A., Thurberg, F.P., Vemberg, F.J. (Eds.), *Pollution physiology of estuarine organisms*. The University of South Carolina Press, Columbia, pp. 107-126.
- Webb, D., 2011. Freshwater shrimp (*Palaemonetes australis*) as a potential bioindicator of crustacean health. *Environ. Monit. Assess.* 178, 537-544. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1711-1>.
- Weis, J.S., Cristini, A., Rao, R.K., 1992. Effects of pollutants on molting and regeneration in Crustacea. *Amer. Zool.* 32, 495-500.
- Weis, J.S., Samson, J., Zhou, T., Skurnick, J., Weis, P., 2001. Prey capture ability of mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) as a behavioral biomarker for contaminants in estuarine systems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58, 1442-1452.
- Wells, P.G., Engelhardt, F.R., Blackman, R.A.A., Howgate, P., Butler, J.N., 1993. Impact of oil and related chemicals on the marine environment. *Rep. Stud. GESAMP*.
- Wells, P.G., Sprague, J.B., 1976. Effects of crude oil on American lobster (*Homarus americanus*) larvae in the laboratory. *J. Fish. Board Canada.* 33, 1604-1614.
- Wester, P.W., 1991. Histopathological effects of environmental pollutants beta-HCH and methyl mercury on reproductive organs in freshwater fish. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 100, 237-249.
- Wheeler, J.R., Grist, E.P.M., Leung, K.M.Y., Morrill, D., Crane, M., 2002. Species sensitivity distributions: data and model choice. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 192-202. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00327-7](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00327-7).
- Wheelock, C.E., Miller, J.L., Miller, M.J., Phillips, B.M., Gee, S.J., Tjeerdema, R.S., Hammock, B.D., 2005. Influence of container adsorption upon observed pyrethroid toxicity to *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. *Aquat. Toxicol.* 74, 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.04.007>.
- Wheelock, C.E., Phillips, B.M., Anderson, B.S., Miller, J.L., Miller, M.J., Hammock, B.D., 2008. Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring

- and toxicity identification evaluations (TIEs). *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 195, 117-178.
- Whitehead, A., Dubansky, B., Bodinier, C., Garcia, T.I., Miles, S., Pilley, C., Raghunathan, V., Roach, J.L., Walker, N., Walter, R.B., Rice, C.D., Galvez, F., 2012. Genomic and physiological footprint of the Deepwater Horizon oil spill on resident marsh fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 20298-20302.
- WHO, 1993. *Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles*, Environmental Health Criteria 155. World Health Organization, Geneva.
- Wolf, J.B., Wade, M.J., 2009. What are maternal effects (and what are they not)? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 1107-1115. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0238>.
- Won, E-J., Rhee, J-S., Shin, K-H., Jung, J-H., Shim, W.J., Lee, Y-M., Lee, J-S., 2013. Expression of three novel cytochrome P450 (CYP) and antioxidative genes from the polychaete, *Perinereis nuntia* exposed to water accommodated fraction (WAF) of Iranian crude oil and Benzo[a]pyrene. *Mar. Environ. Res.* 90, 75-84.
- Wouters, R., Monila, C., Lavens, P., Calderón, J., 2001. Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannamei* in different stages of sexual maturation. *Aquaculture.* 198, 307-323.
- Wu, H.Y., Xu, H.X., Hong, Y.B., Zhang, J.F., Wu, J.C., 2011. The use of biomarkers in the antioxidant responses of *Daphnia magna* to the acute and chronic exposure to no. 20 diesel oil and 2,4-dichlorophenol. *Chem. Spec. Bioavailab.* 23, 80-87. <https://doi.org/10.3184/095422911X13027015402949>.
- Xin, Z., Wenchao, Z., Zhenguang, Y., Yiguo, H., Zhengtao, L., Xianliang, Y., Xiaonan, W., Tingting, L., Liming, Z., 2015. Species sensitivity analysis of heavy metals to freshwater organisms. *Ecotoxicology.* 24, 1621-1631. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1500-2>.
- Xu, J., Strange, J.P., Welker, D.L., James, R.R., 2013. Detoxification and stress response genes expressed in a western North American bumblebee, *Bombus huntii* (Hymenoptera: Apidae). *BMC Genomics.* 14-874, 1-13.
- Yin, Y., Jia, H., Sun, Y., Yu, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y., 2007. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 145, 288-293.
- Zambrano, M., Robinson Casanova, F., Prada, J., Arencibia, G., Vidal, A., Capetillo, N., 2012. Bioacumulación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) (Arcoida: Arcidae). *Gayana.* 76, 1-9.

- Zelati, H., Murthy, S., Nazarkardeh, M., Ahmadiyan, S.H., Meshram, S.J., Amin, A., Swain, H.S., 2016. Influence of dietary supplementation of carotenoid (diacetate of lutein-mesozeaxanthin) on growth performance, biochemical body composition in freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. J. Aquac. Mar. Biol. 4, 1-8.
- Zeliger, H.I., 2003. Toxic effects of chemical mixtures. Arch. Environ. Health. 58, 23-9. <https://doi.org/10.3200/AEOH.58.1.23-29>.
- Zhang, J., Liu, Y.J., Tian, L.X., Yang, H.J., Liang, G.Y., Yue, Y.R., Xu, D-H., 2013. Effects of dietary astaxanthin on growth, antioxidant capacity and gene expression in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquacult. Nutr. 19, 917-927.
- Zhang, J.F., Shen, H., Wang, X.R., Wu, J.C., Xue, Y.Q., 2004a. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater goldfish *Carassius auratus*. Chemosphere. 55, 167-174.
- Zhang, J.F., Sun, Y.Y., Shen, H., Liu H., Wang, X.R., Wu, J.C., Xue, Y.Q., 2004b. Antioxidant response of *Daphnia magna* exposed to no. 20 diesel oil. Chem. Spec. Bioavailab. 16, 139-144.
- Zhang, J.F., Wang, X.R., Guo, H.Y., Wu, J.C., Xue, Y.Q., 2004c. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 58, 110-116. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.08.025>.
- Zhang, Q.L., Li, F.H., Zhang, X.J., Dong, B., Zhang, J.Q., Xie, Y.S., Xiang, J.H., 2008. cDNA cloning, characterization and expression analysis of the antioxidant enzyme gene, catalase, of chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Fish Shellfish Immun. 24, 584-591.
- Zhou, S., Heras, H., Ackman, R.G., 1994. Preparation and characterization of water-soluble fraction of crude oil by a karr reciprocating plate countercurrent extraction column. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 26, 527-533.
- Zou, E., 2005. Impacts of xenobiotics on crustacean molting: the invisible endocrine disruption. Integr. Comp. Biol. 45, 33-38. <https://doi.org/10.1093/icb/45.1.33>.

Trabajo Científico