

**ÁCIDO DELTA-AMINOLEVULÍNICO  
DEHIDRASA (ALA-D) COMO BIOMARCADOR  
DE EXPOSICION A PLOMO EN PECES:  
VARIABILIDAD NATURAL Y DE ORIGEN  
ANTROPICO**

Lombardi, Paula Edith

Director de Tesis: Dra. Verrengia Guerrero, Noemí R.

Codirector de Tesis: Dra. Peri, Silvia I.

Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP

2008

....."Muy recientemente nos hemos enterado de que la naturaleza se cansa, como nosotros, sus hijos; y hemos sabido que, como nosotros, puede morir asesinada. Ya no se habla de *someter* a la naturaleza: ahora hasta sus verdugos dicen que hay que *protegerla*. Pero en uno u otro caso, naturaleza sometida o naturaleza protegida, ella está fuera de nosotros. La civilización que confunde a los relojes con el tiempo, al crecimiento con el desarrollo y a lo grandote con la grandeza, también confunde a la naturaleza con el paisaje, mientras el mundo, laberinto sin centro, se dedica a romper su propio cielo."

( de *Úselo y Tírelo*, Eduardo Galeano, 1994)

*A mi familia*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi reconocimiento a todas las personas que me alentaron a transitar este camino.

A mis excompañeros de trabajo: Patricia Landoni, Natalia Cappelletti, Andrea Barreda, Florencia Arias, Sandra Demichelis, Alejandra Buscalia, Constanza Bisogno y muy especialmente a mi compañero de muestreos, Gustavo Suarez; les agradezco por su amistad y apoyo, esencialmente en los momentos difíciles.

Mi reconocimiento a mi compañera de trabajo Natalia Piol por compartir su espacio de trabajo sin condiciones.

A mi directora Dra. Noemí Verrengia Guerrero por aceptarme en su laboratorio, por creer en mí y alentarme con sus frecuentes consejos y sugerencias.

A mi codirectora Dra. Silvia Peri por brindarme su experiencia y por su disposición a ayudarme en todo momento.

Al personal de postgrado de esta facultad, principalmente a la Dra. Analía Lanteri por su entera disposición y apoyo.

Un muy especial agradecimiento a los pescadores de Berazategui, Berisso y Atalaya, sin la ayuda de los cuales no hubiera sido posible este trabajo de Tesis. Quiero destacar particularmente a Héctor Moreira pescador de Berazategui, por su entera disposición, su amabilidad y por ser una excelente persona.

Finalmente quiero expresar mi agradecimiento a mis padres y hermanos por su amor incondicional y su permanente estímulo. A mi abuela Filomena por enseñarme que sabiduría no es sinónimo de erudición. A mis suegros por su ayuda permanente y su cariño. A Adrián, por su respaldo, paciencia y amor. A mi hija, Bianca, por ser la razón que me estimula a querer ser cada día una mejor persona.

## RESUMEN

La actividad de la enzima ácido  $\delta$ -aminolevulínico dehidrasa (ALA-D) es un reconocido biomarcador específico de exposición a plomo. Debido a sus características ha sido utilizado en estudios de monitoreo ambiental para evaluar la exposición a plomo en diversos organismos, entre ellos peces.

El principal objetivo del presente trabajo de tesis fue validar un método de evaluación general de riesgo ecotoxicológico por exposición a plomo en poblaciones naturales de peces. Para tal fin se seleccionaron tres especies recolectadas del río de la Plata: *Prochilodus lineatus* (sábalo), *Leporinus obtusidens* (boga) y *Cyprinus carpio* (carpa). Las zonas de muestreo elegidas fueron: Berazategui y Berisso ubicadas cerca de las emisiones de residuos cloacales provenientes de las ciudades de Buenos Aires y La Plata. La tercera, Atalaya, libre de emisiones cloacales, pero sujeta a emisiones diversas, todas ellas, de origen antropogénico. Los muestreos se realizaron entre junio de 2002 y mayo de 2004.

En primera instancia se caracterizaron diversos parámetros de la enzima ALA-D en muestras de sangre y de tejido hepático. Los resultados obtenidos mostraron características similares en la enzima sanguínea de todas las especies estudiadas. Lo mismo se observó para la enzima hepática. La comparación entre tejidos mostró diferencias en el valor de Km, siendo menor para la enzima hepática.

Posteriormente, se procedió a validar el uso de la enzima como parámetro biomarcador de exposición a plomo en estudios de campo.

En primer lugar, se analizó la variabilidad de la actividad enzimática en función de factores tales como el sexo, la época de muestreo y el tamaño de los peces. Tanto la actividad de la enzima en sangre como en hígado mostraron gran variabilidad, pero sin presentar ninguna dependencia con el estado nutricional, sexo, edad ni peso corporal de los peces. Por lo tanto se procedió a efectuar análisis de plomo en muestras de sangre, hígado y branquias, a fin de comprobar los niveles de bioacumulación del metal en dichos tejidos, los cuales reflejan el grado de exposición de los organismos. En todos los casos se obtuvieron valores detectables de plomo, los cuales presentaron una variabilidad aún mayor que los niveles de actividad de la enzima. Si bien se encontraron diferencias significativas entre los

distintos muestreos, no se obtuvieron buenas correlaciones entre los niveles de actividad de ALA-D y los niveles de plomo acumulados.

Frente a estos resultados se decidió realizar un estudio de exposición a plomo, empleando ejemplares de *P. lineatus* recolectados en la naturaleza y aclimatados a las condiciones de laboratorio. El objetivo consistió en comprobar si tras un tratamiento subcrónico al metal los peces era capaces de incrementar los niveles de plomo en sus tejidos y de inducir un mayor grado de inhibición enzimática. En caso afirmativo, el estudio permitiría simultáneamente investigar la posibilidad de reactivación de la enzima mediante el empleo de DDT o  $Zn^{2+}$  y de esta forma reducir la variabilidad intraespecífica. Los resultados obtenidos mostraron una mayor acumulación de plomo en los peces expuestos y una reducción en la actividad de ALA-D sanguínea. Los estudios de reactivación sólo presentaron resultados positivos en muestras de sangre, mediante el uso de  $Zn^{+2}$  en concentraciones entre 10 a 20  $\mu M$ . Por lo tanto se procedió a determinar la actividad reactivada de la enzima en sangre. A partir de la relación entre la actividad reactivada y no reactivada se calculó un porcentaje de inhibición, el cual presentó una correlación altamente significativa con el nivel de plomo en sangre.

De acuerdo a estos resultados se procedió a determinar la actividad reactivada y no reactivada de la enzima ALA-D en los peces provenientes de las tres zonas del río de la Plata. En las especies bentónicas como *P. lineatus* y *C. carpio* se observó la misma tendencia: los peces de Berisso y Berazategui mostraron niveles de actividad y un grado de inhibición similares. Mientras que los de Atalaya y Corrientes presentaron mayor actividad enzimática sin registrarse inhibición. Por otro lado, la actividad de la enzima ALA-D en muestras de sangre de la especie pelágica, *L. obtusidens* no presentó diferencias entre zonas así como tampoco mostró inhibición. Es bien conocido que los metales se asocian a las partículas de sedimento. Para los peces de hábitos bentónicos el plomo se encuentra más biodisponible y esto se refleja en los mayores niveles de este metal encontrados en tejido hepático y en la inhibición de la enzima ALA-D.

Debido a la imposibilidad de reactivar la enzima hepática sólo se pudo determinar sus valores de actividad sin reactivar y se procedió a comparar estos valores entre las distintas zonas. La actividad de la enzima hepática no reflejó diferencias entre zonas para ninguna de las especies estudiadas.

Paralelamente a estos estudios se investigaron los efectos de la exposición a plomo sobre los parámetros hematológicos (hemoglobina y hematocrito) e índices morfométricos (factor de condición e índice hepato-somático). Los resultados obtenidos con las distintas especies mostraron la misma respuesta. Ni los parámetros hematológicos ni los índices morfométricos mostraron una relación con la actividad del ALA-D, con el porcentaje de inhibición ni con los niveles de plomo en los distintos tejidos.

Los resultados presentados hasta aquí evidenciaron que las poblaciones de peces bentónicas residentes en las zonas cercanas a descargas cloacales, como Berazategui y Berisso se encuentran expuestas a plomo, principalmente aquellas de hábitos bentónicos. Por otro lado, la determinación del porcentaje de inhibición mediante la reactivación de la actividad del enzima ALA-D constituye un mejor parámetro biomarcador de plomo que la clásica determinación de los valores de actividad, especialmente en un sistema como del río de la Plata donde resulta difícil identificar un sitio de referencia que pueda considerarse libre de contaminación. De esta forma, para programas de monitoreo proponemos la determinación de la actividad reactivada y no reactivada de ALA-D en muestras de sangre de especies de peces bentónicas.

Una vez evaluada la situación de tres especies de peces en un sistema acuático natural expuestos a múltiples contaminantes y factores de estrés se procedió a estudiar la actividad de la enzima ALA-D en una población endogámica de *Cichlasoma facetum*, especie de hábito pelágico. Los ejemplares utilizados en esta etapa provenían de un estanque artificial a cielo abierto, en el cual no se detectó la presencia de plomo en agua. De esta forma se podía estudiar la variabilidad natural en la actividad basal de la enzima ALA-D sin la interferencia de factores de estrés. La caracterización de la enzima ALA-D en sangre e hígado de *C. facetum*, presentó resultados similares a los encontrados en las otras especies de peces estudiadas en este trabajo.

El análisis de la variabilidad natural de la enzima ALA-D en *C. facetum* mostró que la actividad de la misma no se modifica con la época del año así como tampoco presenta diferencias entre sexos. En esta especie no se registró inhibición de la enzima. Esto se corresponde con el hecho de que estos peces proceden de un estanque en el cual no fue detectado plomo, por lo tanto no existe exposición de los mismos a este metal. Así la variabilidad observada se debe meramente a

variaciones intraspecíficas. Con respecto a la enzima hepática los resultados obtenidos resultaron similares a los de la enzima sanguínea y a la hepática de las otras especies estudiadas. En relación a los índices morfométricos y los parámetros hematológicos tampoco presentaron variaciones ni con la época del año ni con el sexo.

Una vez determinado que la actividad de la enzima ALA-D en *C. facetum* se encontraba en su estado basal se procedió a realizar experiencias de exposición a plomo. Los resultados obtenidos se correspondieron con los encontrados en *P. lineatus*.

Debido a las variaciones intraespecíficas, ya sean naturales o de origen antrópico, el análisis de la actividad de ALA-D no siempre resulta un buen biomarcador de exposición a plomo, mientras que la actividad reactivada refleja más acertadamente el grado de contaminación. En consecuencia debería incluirse la reactivación de ALA-D en los estudios de monitoreo ambiental.

## ABSTRACT

The activity of the enzyme  $\delta$ -aminolevulinic dehydratase (ALA-D) has been recognized as a specific biomarker of lead exposure. Therefore, it has been used in several environmental monitoring programs to assess the extent of lead exposure in many species including fish.

The main purpose of the present thesis work was to investigate the usefulness of this biomarker to assess the extent of lead contamination in fish collected from coastal areas along the La Plata River. Three species were selected: *Prochilodus lineatus*, *Leporinus obtusidens* and *Cyprinus carpio*. The sampling stations were Berazategui and Berisso, located at the vicinity of the sewage discharges from Buenos Aires and La Plata cities respectively. The third station, Atalaya, was free of sewage effluents but may be also subjected to different anthropogenic discharges. Samplings were performed each 3-4 months during June 2002 and May 2004.

First of all, some basic characteristics of the enzyme were determined in blood and liver samples obtained from the three species. For each tissue, the enzyme showed similar characteristics between the different fish species. However, the blood enzyme presented some different properties in relation to the liver enzyme. Thus, the affinity constant for the liver ALA-D was lower than the value for the blood enzyme.

Secondly, the enzyme activity was analyzed in both blood and liver tissues from the three species collected in the field to investigate its usefulness as lead biomarker. The influence of different biological and environmental parameters (sex, size and season) on the biomarker response was also investigated. Both blood and liver enzyme activities showed a large variability, but the values did not depend either on the sex, nutritional status, age or weight of the fish.

Afterwards, the levels of lead concentrations were determined in blood, liver and gill samples in order to assess the extent of metal exposure and the resulting bioaccumulation. Detectable lead concentrations were found in all the samples and they showed a higher variability than the values of enzyme activity. Lead levels also showed significant differences among the sampling stations and sampling periods. However, no good correlations could be found between the levels of ALA-D activity and the lead concentrations in the tissues analyzed. In view of these results, the response of the fishes exposed to lead under controlled laboratory conditions was

investigated. For these bioassays, specimens of *P. lineatus* were collected from the field and acclimated to the laboratory conditions. These experiments would allow to establish if the fishes were able to increase the lead content in their tissues and the extent of enzyme inhibition. If so, it would be possible to determine the effect of  $Zn^{2+}$  and/or DDT as enzyme reactivation agents. In this way, the intra-specific enzyme variability could be reduced. The results of the laboratory bioassays showed that effectively the fish presented higher levels of lead in their tissues and also that the blood enzyme activity could be further inhibited. On the other hand, only the blood enzyme could be reactivated by using  $Zn^{2+}$  concentrations within the range of 10 – 20  $\mu M$ . By using the values of the original and reactivated ALA-D activities the percentage of enzyme inhibition were calculated, and showed significant correlations with the blood lead levels.

The values for the reactivated enzyme were calculated in all the blood samples of fish collected from the different sites and the different sampling periods. Benthonic species like *P. lineatus* and *C. carpio* presented the same pattern, as fishes from Berazategui and Berisso showed similar ALA-D activity values and similar enzyme inhibition. Instead, fish from Atalaya and Corrientes showed higher ALA-D activities and no enzyme inhibition. On the other hand, the enzyme activity in blood samples of the pelagic species *L. obtusidens* did not present either enzyme inhibition or significant differences among the sampling stations. It is well known that metal contaminants associate to sediment particles to a great extent. Therefore, lead would be more bioavailable for benthonic fish species. For this reason, higher metal levels were found in the fish tissues and hence higher ALA-D inhibition.

The liver ALA-D could not be reactivated, consequently only the original activity values could be compared. The results showed that the liver enzyme did not present significant differences among the sampling stations or sampling periods for any of the studied fish species.

In addition to the enzymatic study, the effect of lead exposure on the hematological parameters (hemoglobin and hematocrit), and the morphometric indices (the condition factor and the hepatic somatic index) were investigated. The same pattern was observed for the three fish species. Neither the hematological parameters nor the morphometric indices showed significant relationships with the ALA-D activity, the percentage of enzyme inhibition or the lead levels accumulated in the different tissues.

In summary, the populations of fish species that are distributed at the vicinity of the sewage discharges, such as Berazategui and Berisso, are in fact exposed to lead, especially those of benthonic habitats. On the other hand, the determination of the percentage of inhibition, obtained by reactivating the ALA-D enzyme, constitutes an even better biomarker of lead exposure than the single ALA-D activity values, especially for an aquatic system like the la Plata River where no reference sites could be easily identified. Therefore, for monitoring programs measurements of the reactivated and non-reactivated ALA-D activity in blood samples of benthonic species are proposed.

Finally, determinations of ALA-D activity were also performed in an endogamic fish population, *Cichlasoma facetum*; of pelagic habitats. In this case, the animals were collected from an artificial pond where lead was not detected in the water. These studies allowed the investigation of the natural variability of the basal enzyme activity without the interference of environmental stress factors. Both blood and liver ALA-D values from *C. facetum* present the same basic enzymatic characteristics as those found for the other fish species studied. For blood samples, the natural variability of the ALA-D activity values was not modified by the season or by the sex of the fishes. The reactivated activity values did not show significant differences with the non-reactivated values, leading to the conclusion that these last values represent the maximal basal activity levels. This is in agreement with the fact that the specimens were from a pond where lead was not detected. Therefore, the observed variability could be mostly attributed to intra-specific variations. The liver enzyme could not be reactivated, showing a similar pattern than those previously recorded for the other fish species. For both blood and liver ALA-D, the hematological parameters and morphometric indices did not show variations according to the season or the sex of the organisms.

Due to the intraspecific variability, both from natural and anthropogenic origin, analyses of ALA-D activity do not always may be considered as a reliable biomarker of lead exposure. Instead, the reactivated activity reflects more properly the extent of lead contamination. Consequently, this parameter should be included in monitoring programs.

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

%I: porcentaje de inhibición

ALA: ácido delta aminolevulínico

ALA-D: ácido delta-aminolevulínico dehidrasa

ALA-D<sub>R</sub>: actividad reactivada de la enzima ácido delta-aminolevulínico dehidrasa

ALA-S: ácido delta-aminolevulínico sintetasa

CI<sub>50</sub>: concentración inhibitoria 50

DE: desvío estándar

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

FC: factor de condición

Fig.: figura

FPM: fracción postmitocondrial

GR: glóbulos rojos

H: homogenato

Hb: hemoglobina

Hct: hematocrito

IHS: índice hepato-somático

NOEL: nivel de no efecto observado

PAHs: hidrocarburos aromáticos policíclicos

PBG: porfobilinógeno

PCBs: bifenilos policlorados

p-DMAB: p-dimetilaminobenzaldehído

Prot.: proteína

SH: sulfhidrilo

TCA: ácido tricloroacético

U (mg prot)<sup>-1</sup>: unidades de actividad enzimática por miligramo de proteína

U (ml GR)<sup>-1</sup>: unidades de actividad enzimática por mililitro de glóbulos rojos

U: unidad enzimática

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

%I: porcentaje de inhibición

ALA: ácido delta aminolevulínico

ALA-D: ácido delta-aminolevulínico dehidrasa

ALA-D<sub>R</sub>: actividad reactivada de la enzima ácido delta-aminolevulínico dehidrasa

ALA-S: ácido delta-aminolevulínico sintetasa

CI<sub>50</sub>: concentración inhibitoria 50

DE: desvío estándar

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

FC: factor de condición

Fig.: figura

FPM: fracción postmitocondrial

GR: glóbulos rojos

H: homogenato

Hb: hemoglobina

Hct: hematocrito

IHS: índice hepato-somático

NOEL: nivel de no efecto observado

PAHs: hidrocarburos aromáticos policíclicos

PBG: porfobilinógeno

PCBs: bifenilos policlorados

p-DMAB: p-dimetilaminobenzaldehído

Prot.: proteína

SH: sulfhidrilo

TCA: ácido tricloroacético

U (mg prot)<sup>-1</sup>: unidades de actividad enzimática por miligramo de proteína

U (ml GR)<sup>-1</sup>: unidades de actividad enzimática por mililitro de glóbulos rojos

U: unidad enzimática

**ÍNDICE GENERAL**

Página

<b>RESUMEN</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>I. Sistemas acuáticos</b> .....	1
I. 1. Estuario del río de la Plata.....	3
<b>II. Contaminantes en sistemas acuáticos</b> .....	7
II. 1. Fuentes de emisión.....	8
II. 2. Especiación.....	9
II. 3. Distribución.....	10
II. 4. Transformación.....	14
<b>III. Contaminantes metálicos</b> .....	16
III. 1. Plomo.....	19
<b>IV. Efectos de los metales sobre los organismos</b> .....	21
IV. 1. Procesos toxicocinéticos.....	23
IV. 2. Toxicodinámica.....	28
<b>V. Biomarcadores</b> .....	31
V. 1. Definición y clasificación de los biomarcadores.....	32
V. 2. Tipos de biomarcadores.....	33
V. 3. Ventajas y necesidad del uso de biomarcadores en el monitoreo ambiental.....	36
V. 4. Usos y estrategias de la aplicación de biomarcadores en monitoreo ambiental.....	39
V. 5. Limitaciones del uso de biomarcadores en el biomonitoreo ambiental.....	40
<b>VI. Acido δ-aminolevulínico dehidrasa (ALA-D)</b> .....	41
VI. 1. Interacción de metales con la enzima ALA-D y su uso como biomarcador.....	45
VI. 2. Reactivación de la actividad de la enzima ALA-D.....	46
<b>VII. Organismos seleccionados para estudios de monitoreo ambiental</b> .....	47
VII.1. Breve caracterización de las especies utilizadas en este trabajo	
VII. 1.1. <i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes, 1847).....	48
VII. 1. 2. <i>Cyprinus carpio</i> (Linnaeus, 1758).....	51
VII. 1. 3. <i>Leporinus obtusidens</i> (Valenciennes, 1847).....	53
VII. 1. 4. <i>Cichlasoma facetum</i> (Jenyns, 1842).....	54
<b>VIII. Hipótesis más relevantes</b> .....	56
<b>IX. Objetivos</b>	
IX. 1. Objetivo general.....	56
IX. 2. Objetivos particulares.....	56

## MATERIALES Y MÉTODOS

<b>I. Recolección de peces</b>	
I. 1. <i>Prochilodus lineatus</i> .....	58
I. 1. 1. Características generales de los ejemplares de <i>P. lineatus</i> .....	58
I. 2. <i>Leporinus obtusidens</i> y <i>Cyprinus carpio</i> .....	60
I. 2. 1. Características generales de los ejemplares.....	60
I. 3. <i>Cichlasoma facetum</i> .....	61
I. 3. 1. Características generales de los ejemplares de <i>C. facetum</i> .....	61
<b>II. Materiales, reactivos y condiciones de trabajo</b> .....	62
<b>III. Tratamiento y separación de muestras</b> .....	63
<b>IV. Técnica de determinación de la actividad de la enzima ALA-D</b> .....	65
IV. 1. Optimización de la metodología para la determinación de la actividad de la enzima ALA-D en sangre.	
IV. 1. 1. Estudio de la actividad de la enzima ALA-D en función del pH de la solución reguladora del medio de incubación.....	67
IV. 1. 2. Estudio de la actividad de la enzima ALA-D en relación a la temperatura de reacción.....	68
IV. 1. 3. Estudio de la actividad de la enzima ALA-D en función de la concentración de sustrato.....	68
IV. 1. 4. Estudio de la conservación de las muestras.....	68
IV. 1. 5. Reactivación de la actividad de la enzima ALA-D mediante el empleo de DTT, Zn <sup>2+</sup> o una combinación de ambos.....	69
IV. 2. Optimización de la metodología para la determinación de la actividad de la enzima ALA-D en tejido hepático.	
IV. 2. 1. Estudio de la actividad de la enzima ALA-D en homogenato y fracción postmitocondrial.....	70
IV. 2. 2. Estudio de la actividad de la enzima ALA-D en función del pH de la solución reguladora del medio de incubación.....	70
IV. 2. 3. Estudio de la actividad de la enzima ALA-D en relación a la temperatura de reacción.....	70
IV. 2. 4. Estudio de la actividad de la enzima ALA-D en función de la concentración de sustrato.....	71
IV. 2. 5. Reactivación de la actividad de la enzima ALA-D en muestras de tejido hepático mediante el empleo de Zn <sup>2+</sup> .....	71
<b>V. Determinación del contenido de proteínas</b> .....	72
<b>VI. Determinación del contenido de hemoglobina</b> .....	72
<b>VII. Determinación del contenido de plomo</b> .....	72

<b>IX Experiencias de laboratorio</b> .....	73
IX.1. <i>Prochilodus lineatus</i> .....	73
IX. 2. <i>Cichlasoma facetum</i> .....	75
<b>X. Determinación de los índices morfométricos</b> .....	75
<b>XI. Análisis estadísticos</b> .....	76

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<b>I. Caracterización de la enzima ALA-D en tejido sanguíneo y hepático de <i>Prochilodus lineatus</i></b> .....	78
I. 1. Sangre	
I. 1. 1. Actividad de la enzima ALA-D en función del pH del medio de incubación.....	79
I. 1. 2. Actividad de la enzima ALA-D en función de la temperatura de reacción.....	80
I. 1. 1. Actividad de la enzima ALA-D en función de la concentración de sustrato.....	81
I. 1. 3. Estudio de la conservación de las muestras de sangre en nitrógeno líquido.....	82
I. 2. Tejido hepático	
I. 2. 1 Actividad de la enzima ALA-D en homogenato y fracción postmitocondrial.....	82
I. 2. 2. Actividad de la enzima ALA-D en función del pH del medio de incubación.....	83
I. 2. 3. Actividad de la enzima ALA-D en función de la temperatura de reacción.....	83
I. 2. 4. Actividad de la enzima ALA-D en función de la concentración de sustrato.....	85
I. 3. Discusión.....	85
<b>II. Niveles de actividad de la enzima ALA-D en <i>P. lineatus</i> de Berazategui</b> .....	88
II. 1. Niveles de actividad de la enzima ALA-D y su relación con el sexo, edad y peso corporal de los peces	
II. 1. 1. Sangre.....	88
II. 1. 2. Tejido hepático.....	89
II. 2. Índices morfométricos.....	90
II. 3. Niveles de plomo en muestras de sangre, tejido hepático y branquias de <i>P. lineatus</i> .....	92
II. 4. Relaciones entre la actividad de ALA-D y los niveles de plomo.....	93
II. 5. Discusión.....	99

---

<b>III. Actividad de la enzima ALA-D en <i>P. lineatus</i>. Estudios de laboratorio</b> .....	103
III. 1. Niveles de actividad de la enzima ALA-D	
III. 1. 1. Sangre.....	103
III.1.2. Tejido hepático.....	104
III. 2. Niveles de plomo en muestras de sangre y tejido hepático.....	105
III. 3. Reactivación de la actividad de la enzima ALA-D mediante el empleo de DTT y Zn <sup>2+</sup>	
III. 3. 1. Sangre	
III. 3. 1. 1. DTT.....	106
III. 3. 1. 2. Zn <sup>2+</sup> .....	107
III. 3. 1. 3. Mezcla DTT - Zn <sup>2+</sup> .....	108
III. 3. 2. Tejido hepático	
III. 3. 2. 1. DTT.....	109
III. 3. 2. 2. Zn <sup>2+</sup> .....	109
III. 4. Inhibición de la actividad de la enzima ALA-D en sangre.....	111
III. 5. Relaciones entre los niveles de plomo y la actividad de la enzima ALA-D.....	112
III. 6. Efectos del plomo sobre la actividad de ALA-D.....	114
III. 7. Parámetros hematológicos.....	115
III. 8. Índices morfométricos.....	116
III. 9. Parámetros hematológicos e índices morfométricos y su relación con la actividad del ALA-D y el nivel de plomo.....	118
III. 10. Discusión.....	118
<b>IV. Inhibición de la actividad de la enzima ALA-D en <i>P. lineatus</i> de Berazategui</b> .....	123
IV. 1. Niveles de actividad reactivada y porcentaje de inhibición de la enzima ALA-D en muestras de sangre.....	123
IV. 2. Relaciones entre los parámetros estudiados.....	124
IV. 3. Efectos del plomo sobre la actividad de ALA-D.....	126
IV. 4. Parámetros hematológicos.....	127
IV. 4. 1. Parámetros hematológicos y su relación con la actividad del ALA-D y el nivel de plomo.....	129
IV. 5. Discusión.....	129
<b>V. Actividad de la enzima ALA-D en <i>P. lineatus</i> recolectados de distintas zonas</b> .....	132
V. 1. Niveles de actividad de la enzima ALA-D y su relación con el sexo, edad y peso corporal de los peces	

---

V. 1. 1. 1. Sangre.....	132
V. 1. 1. 2. Variación en los niveles de actividad de ALA-D, ALA-DR y %I, entre zonas.....	134
V. 1. 2. 1. Tejido hepático.....	135
V. 1. 2. 2. Variación en los niveles de actividad específica de la enzima ALA-D entre zonas.....	137
V. 2. 1. Índices morfométricos.....	137
V. 2. 2. Variación de los índices morfométricos entre zonas.....	139
V. 3. Niveles de plomo en muestras de sangre, tejido hepático y branquias de <i>P. lineatus</i> .....	141
V. 4. Relaciones entre la actividad del ALA-D y los niveles de plomo.....	143
V. 5. Efectos del plomo sobre la actividad de ALA-D sanguínea.....	147
V. 6. Parámetros hematológicos.....	148
V. 6. 1. Parámetros hematológicos y su relación con la actividad del ALA-D y el nivel de plomo.....	149
V. 6. 2. Variación en los parámetros hematológicos entre zonas.....	150
V. 7. Discusión.....	152
<b>VI. Niveles de actividad de la enzima ALA-D en <i>Leporinus obtusidens</i> y <i>Cyprinus carpio</i> de distintas zonas del río de la Plata.....</b>	<b>156</b>
VI.1. Caracterización de la enzima ALA-D en sangre	
VI. 1. 1. Actividad de la enzima ALA-D en función del pH del medio de incubación.....	156
VI. 1. 2. Actividad de la enzima ALA-D en función de la concentración de sustrato.....	157
VI. 1. 3. Reactivación de la actividad sanguínea de la enzima ALA-D mediante el empleo de Zn <sup>2+</sup> .....	159
VI. 2. Niveles de actividad de la enzima ALA-D en muestras de sangre.....	160
VI. 3. Índices morfométricos.....	161
VI. 4. Niveles de plomo en muestras de tejido hepático y branquias.....	161
VI. 5. Parámetros hematológicos.....	164
VI. 6. Discusión.....	164
<b>VII. Niveles de actividad de la enzima ALA-D en <i>Cichlasoma facetum</i>.....</b>	<b>167</b>
VII. 1. Caracterización de la enzima ALA-D en tejido sanguíneo y hepático de <i>Cichlasoma facetum</i>	
VII. 1. 1. Sangre	
VII.1.1.1. Actividad de la enzima ALA-D en función del pH del medio de incubación.....	167

---

VII.1.1.2. Actividad de la enzima ALA-D en función de la temperatura de reacción.....	167
VII.1.1.3. Actividad de la enzima ALA-D en función de la concentración de sustrato.....	168
VII. 1. 2. Tejido hepático	
VII. 1. 2. 1. Actividad de la enzima ALA-D en función del pH del medio de incubación.....	169
VII. 1. 2. 2. Actividad de la enzima ALA-D en función de la temperatura de reacción.....	169
VII. 1. 2. 3. Actividad de la enzima ALA-D en función de la concentración de sustrato.....	170
VII. 2. Niveles de actividad de la enzima ALA-D	
VII. 2. 1. Sangre.....	171
VII. 2. 2. Tejido hepático.....	173
VII. 3. Índices morfométricos.....	174
VII. 4. Parámetros hematológicos.....	174
VII. 5. Relaciones entre los parámetros estudiados.....	177
VII. 6. Discusión.....	177
<b>VIII. Actividad de la enzima ALA-D en <i>C. facetum</i>. Estudios de laboratorio.....</b>	<b>180</b>
VIII. 1. Reactivación de la actividad de la enzima ALA-D mediante el empleo de Zn <sup>2+</sup> .....	180
VIII. 2. Niveles de actividad y %I de la enzima ALA-D en muestras de sangre.....	180
VIII. 3 Niveles de actividad de la enzima ALA-D en muestras de tejido hepático.....	182
VIII. 4. Niveles de plomo en muestras de organismos enteros.....	182
VIII. 5. Parámetros hematológicos.....	183
VIII. 6. Índices morfométricos.....	183
VIII. 7. Discusión.....	184
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>185</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA CITADA.....</b>	<b>188</b>

# INTRODUCCIÓN

## I. SISTEMAS ACUÁTICOS

Los sistemas acuáticos ocupan aproximadamente el 75 % de la superficie terrestre. Pero sólo el 0,003 % del volumen total de agua es explotable, aunque ésta es reciclada por el ciclo hidrológico. No sólo el agua dulce es esencial para la vida, sino que claramente constituye un recurso relativamente escaso (Mason, 1996).

Los sistemas acuáticos constituyen a escala global los sistemas más severamente afectados por diversos problemas de contaminación. Muchos recursos de agua dulce han sido contaminados debido a múltiples actividades de origen antropogénico (Monserrat et al, 2006). En los últimos años varios miles de sustancias químicas contaminantes, tales como por ejemplo cadmio, cobalto, cobre, cromo, mercurio, níquel, plomo y zinc, bifenilos policlorados (PCBs), pesticidas organoclorados (OCPs), hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), furanos y dioxinas, entre otros han sido liberados al ambiente. Durante la pasada década de 1960, la humanidad comienza a tomar conciencia de los efectos adversos potenciales a largo plazo de dichas sustancias y de su riesgo potencial para los sistemas acuáticos y terrestres en particular (Mason, 1996).

El impacto de los contaminantes sobre los ecosistemas acuáticos se puede generalizar mediante un diagrama de flujos, como el de la Fig. 1. Las distintas fases representadas en dicha figura serán tratadas más detalladamente con posterioridad.

Resulta importante considerar en este punto que las comunidades biológicas de los sistemas acuáticos son especialmente sensibles a la presencia de sustancias químicas contaminantes. Esto depende en gran parte a que la mayoría de las especies predominantes poseen ciclos de vida relativamente cortos y ciclos reproductivos muy frecuentes, que fácilmente pueden ser afectados por perturbaciones del medio (Ketchum, 1983). Además, en los sistemas acuáticos muchos contaminantes se encuentran constantemente movilizados, debido a las características hidrológicas y propiedades fisicoquímicas de estos sistemas que promueven condiciones siempre fluctuantes (Ford, 1989; Pratt, 1990).

En la actualidad, el estudio de la contaminación de los sistemas acuáticos y el desarrollo de programas de protección de los mismos no sólo tienen una importancia

desde el punto de vista ambiental, sino también por sus implicancias en la salud humana (Viessman, 1990; Okun, 1991; Briscoe, 1993). Cabe recordar que muchas poblaciones obtienen el agua de bebida a partir de sistemas acuáticos. En consecuencia, la ingestión de agua contaminada con bacterias, organismos patógenos o sustancias químicas está asociada a numerosas enfermedades y mortandad en todo el mundo (Rand, 1995; Mason, 1996).

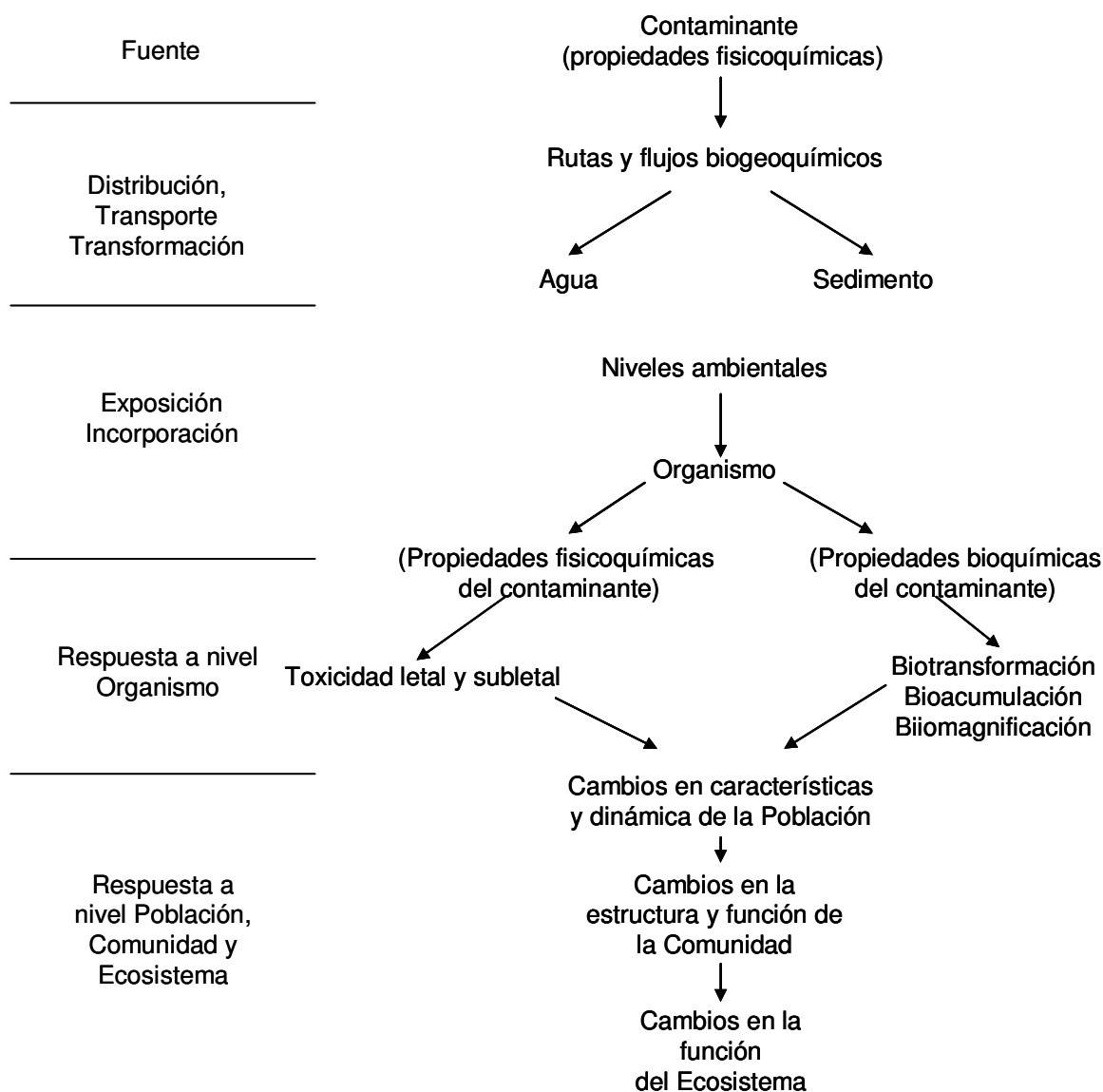


Fig. 1. Impacto de las sustancias químicas contaminantes sobre los organismos y ecosistemas (adaptado de Mason, 1996).

La presencia de metales pesados en los sistemas acuáticos resulta particularmente importante, ya que se los considera como contaminantes relevantes. Se trata de sustancias persistentes, capaces de inducir una amplia gama de efectos tóxicos y con un alto potencial de acumulación, aún en niveles de concentración moderados. Los metales pesados más relevantes desde el punto de vista de la salud humana son el mercurio, el cadmio y el plomo (Mason, 1996).

Por último, los sistemas acuáticos pueden ser clasificados de acuerdo a su naturaleza en marinos, de agua dulce y estuarios. Estos últimos se pueden definir como sistemas en los cuales las aguas de un río se conectan libremente con las del mar (Ketchum, 1983). Los estuarios están sujetos simultáneamente a la dinámica del río y a la del mar. Estos sistemas frecuentemente se caracterizan por su alta productividad y generalmente constituyen el sitio donde se desarrollan las larvas de un gran número de especies de peces, moluscos y crustáceos. Actualmente se considera que la mayoría de los estuarios del mundo se encuentran contaminados, constituyendo además una de las principales fuentes de contaminación de los ambientes marinos (Ketchum, 1983; GESAMP, 1987; UNESCO, 1988). También se estima que las zonas costeras, son las que sufren el mayor impacto derivado de la liberación de sustancias químicas en los ambientes acuáticos (GESAMP, 1991; Moore et al., 2004).

Para el presente trabajo fueron seleccionadas ciertas zonas costeras del estuario del río de la Plata. Este sistema constituye una importante fuente de recursos alimenticios y de agua potable, un medio de transporte, un lugar de recreación y esparcimiento. Así como también representa un sistema seriamente contaminado. A continuación se describirán algunas de sus características más relevantes.

### **I. 1. Estuario del río de la Plata**

La cuenca del río de la Plata se destaca por su extensión entre las más importantes del mundo, abarcando parcialmente los territorios de Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay. El río de la Plata constituye el último eslabón de esta cuenca y es el resultado del aporte de dos grandes ríos, el Paraná con un caudal del

orden de los 17.000 m<sup>3</sup>/s y el Uruguay con un caudal aproximado de unos 5.000 m<sup>3</sup>/s (Fig. 2).

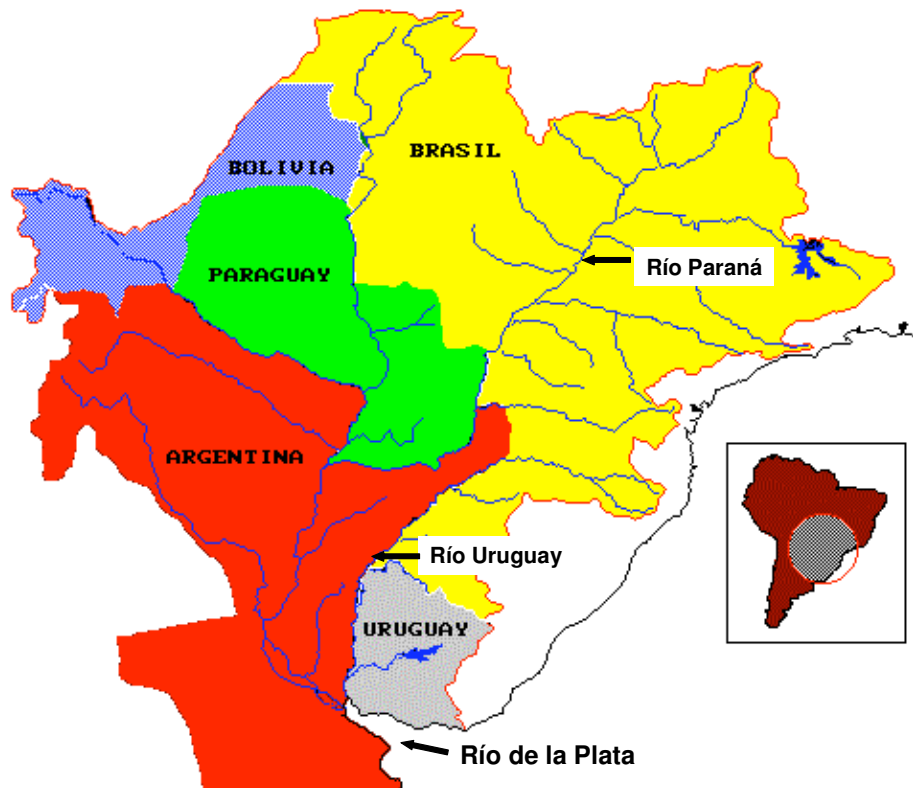


Fig. 2. Cuenca del río de la Plata (tomado de Comité Intergubernamental Coordinador ,CIC, de los Países de la Cuenca del Plata, 2008 [www.cicplata.org](http://www.cicplata.org))

El río de la Plata tiene una longitud aproximada total de 300 Km. y su ancho aumenta progresivamente desde el delta del Paraná, donde alcanza unos 40 Km. hasta superar los 200 km. Abarca una superficie de 35.000 km<sup>2</sup> y su caudal es de 16-28.000 m<sup>3</sup>/s. En su curso se pueden diferenciar tres zonas (Fig. 3), el río de la Plata Superior, Medio y Exterior (Dagnino Pastore, 1973).

Uno de los rasgos sobresalientes de este río es su escasa profundidad, la media es de alrededor de 6 m, y la existencia de áreas deposicionales y erosionales en los que predominan limos y arcillas, aportadas principalmente por el río Paraná que acarrea grandes cantidades de material en suspensión, que le confiere su color amarronado tan

característico. La escasa profundidad media constituye un factor negativo para los mecanismos de autodepuración (AGOSBA-OSN-SIHN, 1992).

La concentración de material en suspensión varía entre 50 y 300 mg/L. Aproximadamente en la línea Punta Piedras - Punta Brava, como consecuencia de las corrientes marinas, se encuentra una zona de turbulencias, que provoca la resuspensión del material particulado, obteniéndose allí los máximos valores de concentración para aguas superficiales. Pasada esta zona de turbulencia, los valores decrecen, ya que prevalecen los procesos de sedimentación. Así, muchos contaminantes, principalmente los asociados al material particulado, quedan atrapados en el sedimento del río, sin llegar al mar (Bazán y Arraga, 1993).

La salinidad promedio para las zonas del río de la Plata superior y medio oscila entre 0,2 a 0,4 ‰, rango típico para sistemas fluviales (Bazán y Arraga, 1993).

Sobre la margen sur del río de la Plata, desde San Isidro hasta Magdalena, se asienta la mayor concentración de habitantes del país, aproximadamente el 40% de la población total, así como también gran cantidad de industrias; desaguando sobre su costa una serie de canales, ríos y efluentes cloacales e industriales que producen el mayor impacto en la franja costera, generalmente hasta los 4 Km. de la línea de la costa. Esta zona también recibe el aporte de contaminantes provenientes de los ríos Paraná y Uruguay (AA-AGOSBA-ILPLA-SHN, 1997).

La franja costera Sur sustenta una serie de usos múltiples; productivos, como destilerías, puertos y plantas productoras de energía; recreativos, como náutica y zona de balnearios; agrícolas y como principal fuente de provisión de aguas crudas para la potabilización, destinadas a satisfacer las necesidades de aproximadamente 10 millones de habitantes. (AA-AGOSBA-ILPLA-SHN, 1997).

Cabe destacar que a partir de estudios realizados por la CARP (1989) y por el Consejo Permanente para el Monitoreo de la Calidad de las Aguas de la Franja Costera Sur (1997), puede observarse que el agua del río de la Plata cumple con los estándares de calidad establecidos para protección de la biota acuática a partir de los 4 Km. de la costa; a excepción del área comprendida entre el Riachuelo y Berazategui. Esto se debe al efecto de dilución del río y a su dinámica fluvial. Sin embargo, la calidad de los sedimentos se encuentra comprometida debido a los aportes de contaminantes,

principalmente en aquellas áreas correspondientes al Riachuelo y a la descarga cloacal de Berazategui (Carsen, 2003).

Las principales fuentes de contaminantes provenientes del área metropolitana de Buenos Aires son los efluentes cloacales e industriales aportados por la Cuenca Matanza - Riachuelo, el río Reconquista y el emisario cloacal de Berazategui, así como los canales Sarandi y Santo Domingo. En lo que respecta al Gran La Plata, las principales fuentes son la descarga cloacal de Berisso y el río Santiago. Éste recibe los aportes de los arroyos Gato Zanjón y el Canal Oeste que son receptores de efluentes correspondientes al polo petroquímico Ensenada - Berisso y de industrias tales como astilleros navales, metalúrgicas y fábricas de ácido sulfúrico. Hasta el momento, sólo se dispone de información suficiente para cuantificar el flujo de contaminantes correspondientes al área Metropolitana de Buenos Aires, no existiendo datos suficientes para el área del Gran La Plata (Carsen, 2003).

Con respecto específicamente al aporte de plomo, se calcula que la descarga diaria de este metal es de 289 Kg., siendo las principales fuentes el río Luján (22%), Riachuelo (30%) y Santo Domingo (10%). Para la descarga de Berazategui se considera una concentración de  $25,34 \mu\text{g Pb L}^{-1}$  (Carsen, 2003).

Los niveles de plomo medios registrados en la columna de agua oscilan entre 1 a  $10 \mu\text{g/L}$  (FCN, 1997), aunque en algunas zonas la concentración de este metal llega a niveles de  $50$  a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , muy superior al límite sugerido para la protección de la biota acuática, el cual es de  $13 \mu\text{g L}^{-1}$  (SSRH, 2002). La presencia de metales pesados en la columna de agua se refleja en los sedimentos, especialmente en los alrededores a las zonas más pobladas e industrializadas y con mayor proporción de limos y arcillas, correspondientes a la zona comprendida entre la ciudad de Buenos Aires y la Plata. Para la zona correspondiente a la descarga de Berazategui la concentración de plomo en sedimentos es de  $72 \mu\text{g/g}$  de peso seco (Frías y Janiot, 2000).

Las zonas de muestreo elegidas para el presente trabajo comprenden dos zonas problemáticas desde el punto de vista ambiental: Berazategui y Berisso y una zona alejada de un efluente cloacal: Atalaya (Fig. 3). La descarga cloacal de Berazategui es un emisario de 5 m de diámetro y 2,5 km. de largo que vuelca, prácticamente sin tratamiento, efluentes provenientes del Área Metropolitana de Buenos Aires,

correspondientes a más de 5.000.000 de personas. El colector mayor de Berisso vuelca efluentes cloacales sin tratamiento previo correspondientes aproximadamente a 200.000 personas (AA-AGOSBA-ILPLA-SHN, 1997).

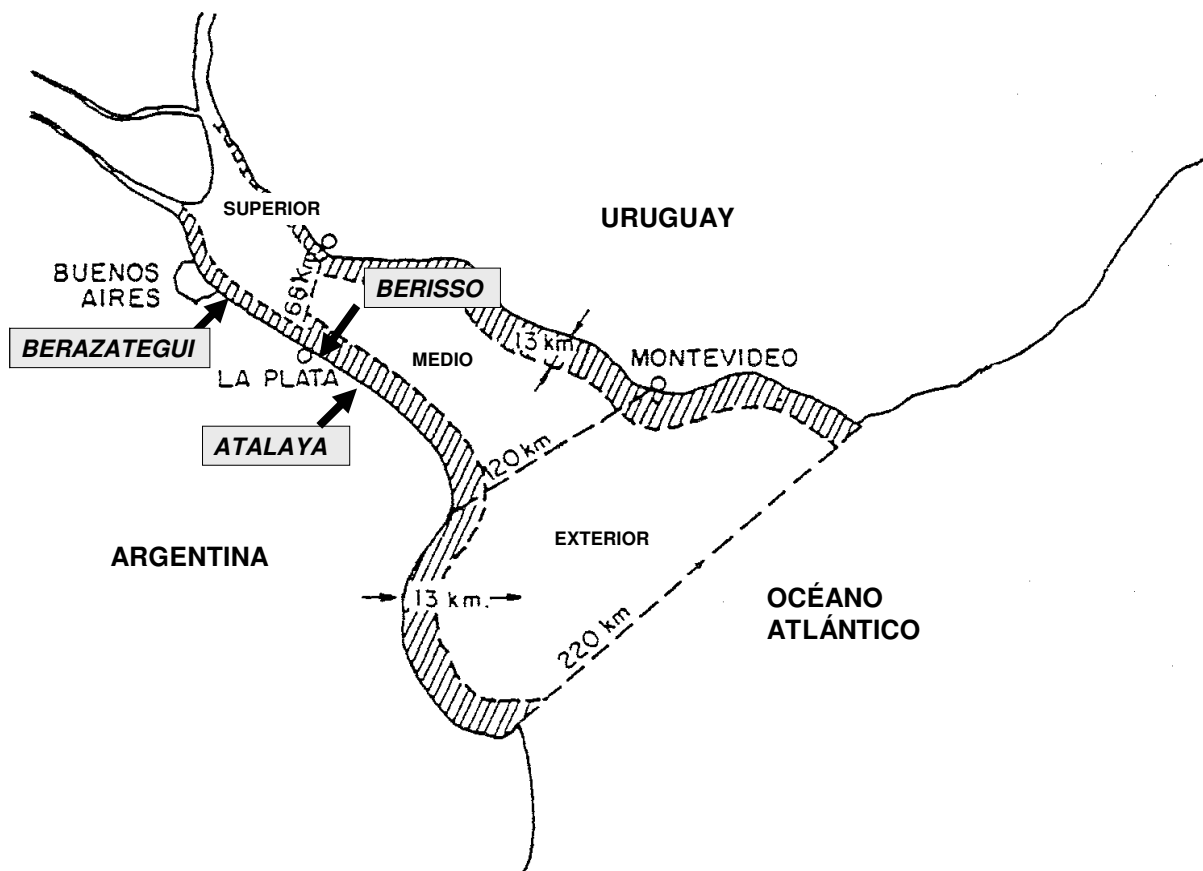


Fig. 3. Río de la Plata, zonas de muestreo

## II. CONTAMINANTES EN SISTEMAS ACUÁTICOS

El destino ambiental de un contaminante depende de las propiedades físico químicas de la sustancia, las cuales son específicas y universales, y de los procesos del entorno, los cuales varían según el ecosistema (Newman y Unger, 2003). Los procesos ambientales engloban a todos los fenómenos que se verifican a partir de la emisión del contaminante hasta su incorporación en la biota. Así se consideran como procesos ambientales a:

- Fuente: incluye las tasas y fuentes de emisión del contaminante al ambiente
- Especiación: considera la especie o forma química del contaminante
- Transporte: incluye todos los procesos de distribución del contaminante entre las distintas fases del ambiente
- Transformación: incluye los mecanismos de modificación del contaminante en cada fase y la formación de derivados

A continuación trataremos cada proceso específicamente para sistemas acuáticos y para elementos metálicos, en particular plomo.

## **II.1. Fuentes de emisión**

Las fuentes de emisión de sustancias químicas han sido clasificadas de forma diversa de acuerdo a distintos criterios. Uno de ellos considera el origen, así podemos distinguir entre fuentes naturales, como por ejemplo emisiones volcánicas o incendios de bosques y fuentes antrópicas, como emisiones industriales, domésticas, agrícolas (Truhaut, 1977; Nriagu, 1990; Menzer, 1991).

Algunas fuentes son estacionarias, tales como las descargas de efluentes; mientras que otras son móviles, tales como las emisiones provenientes de los escapes de diversos vehículos (Morgan y Bretthauer, 1977).

Si se considera la duración de la emisión, se pueden distinguir fuentes continuas, las cuales descargan en forma regular o permanente; fuentes intermitentes y fuentes accidentales, como por ejemplo como consecuencia de un derrame accidental de petróleo (Mc Cahon y Pascoe, 1990; Menzer, 1991; Mason, 1996). Por último se las puede clasificar como puntuales, difusas o atmosféricas. Las fuentes puntuales son discretas e identificables y el alcance de su emisión está relativamente localizado. Las fuentes difusas introducen contaminantes a través de vías dispersas, pobremente definidas; están asociadas a eventos tales como el drenaje, la percolación, el escurrimiento, etc. Las fuentes atmosféricas son de largo alcance, distribuyen los contaminantes a escala regional y global; incluyen las deposiciones secas o húmedas (Smith et al., 1987; Menzer, 1991).

## II. 2. Especiación

La especiación se refiere al estado, forma o distintas especies químicas en que se encuentra un compuesto o elemento en el ambiente (Florence et al., 1992; Newman y Unger, 2003). En el caso particular de los elementos metálicos, éstos pueden presentarse bajo una amplia gama de formas químicas, según se describe a continuación:

- especies iónicas libres, generalmente hidratadas, en uno o varios estados de oxidación
  - formando complejos con ligandos de naturaleza inorgánica
  - formando complejos con ligandos de naturaleza orgánica
  - adsorbidos sobre superficies coloidales, el material en suspensión y/o los sedimentos del lecho
  - adsorbidos o absorbidos por la biota

La especiación de los metales en los sistemas acuáticos depende de factores específicos físico - químicos que actúan localmente en el ambiente. Factores tales como la salinidad, concentración de materia orgánica disuelta, pH, dureza y sedimentación influyen sobre la forma química del metal en el ambiente acuático. Estos factores no sólo afectan la biodisponibilidad y toxicidad del metal sino también la vía de ingreso al organismo. Así, la exposición efectiva a determinado metal para un organismo no está determinada únicamente por la concentración del metal en un ambiente en particular; sino por la concentración de una forma química (Roesijadi y Robinson, 1994).

Se considera que una proporción muy pequeña de los elementos metálicos se encuentra en la llamada fase acuosa soluble, generalmente como iones hidratados. La mayor proporción está asociada a los sedimentos del lecho o al material en suspensión (Rand, 1995). Una proporción intermedia se encuentra complejada con sustancias orgánicas e inorgánicas, de origen natural o antropogénico. Esta proporción es muy variable, dependiendo del tipo y concentración de los agentes complejantes presentes.

Entre los principales ligandos inorgánicos se pueden citar:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{SH}^-$ ,  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{CN}^-$ , entre otros (Florence et al., 1992). La

concentración de  $\text{Cl}^-$  es responsable de la salinidad que presenta un sistema acuático. La concentración de iones  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{CO}_3^{2-}$  da cuenta de la alcalinidad de las aguas. Además, algunos de los compuestos inorgánicos que contienen átomos de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre o fósforo, están involucrados en la productividad primaria, esencial para el desarrollo de los seres vivos. Por otro lado, la presencia de ciertos ligandos es consecuencia de actividades antropogénicas, como por ejemplo el  $\text{CN}^-$  (Brezonik et al., 1991).

Entre los ligandos orgánicos naturales se destacan las sustancias húmicas, las cuales se producen como consecuencia de la descomposición de tejidos biológicos, especialmente vegetales y se encuentran distribuidas en casi todos los sistemas acuáticos. En menor proporción se pueden encontrar también algunos compuestos nitrogenados, derivados principalmente de aminoácidos, péptidos y proteínas (Rand, 1995).

En cuanto a los ligandos orgánicos sintéticos, en varias descargas industriales se ha detectado la presencia de ácido nitriloacético (NTA) y el etilendiaminotetracético (EDTA). La importancia relativa de estas sustancias como potenciales agentes complejantes dependerá de la frecuencia y magnitud de la descarga (Brezonik et al., 1991).

### **II. 3. Distribución**

El fenómeno de distribución de un contaminante en un sistema acuático es sumamente complejo y como se dijo anteriormente depende de las propiedades físico-químicas del contaminante, pero también de los procesos físico - químicos característicos del ambiente en estudio (Newman y Unger, 2003).

Los sistemas acuáticos no son homogéneos, por el contrario en ellos pueden distinguirse diversas fases, o subcompartimientos, en los cuales se van a distribuir las sustancias químicas que se liberen en ellos, a partir de las diversas fuentes. El transporte del contaminante está influido por la partición del elemento entre las distintas fases o compartimientos. Si bien el equilibrio termodinámico raramente ocurre en el ambiente natural, la partición puede ser asumida como cercana al estado de equilibrio

en las condiciones locales, permitiendo la descripción y predicción de estos procesos. Si el sistema está en equilibrio, el coeficiente de partición ( $K_p$ ) describe la cantidad relativa del contaminante en cada fase. Este coeficiente se define como el cociente entre la concentración o actividad del contaminante en una fase y la concentración o actividad en otra fase (Newman y Unger, 2003):

$$K_p = [X]_{\text{fase b}} / [X]_{\text{fase a}}$$

Las fases o subcompartimientos que se pueden reconocer en un sistema acuático son

- fase acuosa soluble
- coloides y micelas
- material en suspensión
- sedimentos del lecho
- diversos organismos biológicos

Por convención la fase acuosa soluble es aquella obtenida por medio de un proceso de filtración a través de un poro de  $0,45 \mu\text{m}$  (US EPA, 1971; Brown et al., 1974; APHA-AWWA-WPCF, 1980; Ashton y Chan, 1987). La magnitud de la distribución de un contaminante en esta fase depende en gran medida de la solubilidad intrínseca de esta sustancia.

Ya hemos mencionado que una proporción muy pequeña de los elementos metálicos se encuentra en la fase acuosa soluble. Esta proporción puede aumentar por un incremento en la acidez del sistema, o por la presencia de ligandos que formen complejos solubles. Por ejemplo, el material húmico constituye entre el 50 y el 80 % del contenido total de carbono orgánico disuelto en la fase acuosa (Abbt-Braun et al., 1989).

Resulta importante mencionar que en la interfase agua / atmósfera se distingue una microcapa de aproximadamente  $50 \mu\text{m}$  de espesor, en la cual se registran concentraciones singularmente elevadas de contaminantes. Esta elevada concentración estaría promovida por los procesos de transporte atmosféricos, una alta actividad bacteriana y del plancton, así como de las burbujas que se originan a nivel superficial. Además en esta microcapa también se encuentran elevadas concentraciones de

carbono orgánico, disuelto o particulado; que desempeñan un rol fundamental en el transporte de contaminantes entre la atmósfera y el medio acuático (Duce et al., 1972; Piotrowicz et al., 1972; Jing y Wei-Wen, 1988; Malins y Ostrander, 1991).

El término coloide hace referencia a partículas discretas, de dimensiones en el orden de  $\mu\text{m}$  a  $\text{nm}$  y de composición variada. Algunas derivan de tejidos biológicos muertos (Means y Wijayaratne, 1982; Witkowski et al., 1987) y otras de surfactantes iónicos, como los detergentes (Quiroga et al., 1989). Las partículas coloidales se caracterizan por presentar una fase interior no polar, compuesta por hidrocarburos; una fase exterior iónica, y una región de polaridad intermedia (Valsaraj y Thibodeaux, 1989). Las especies iónicas de los metales pueden interaccionar con la fase exterior de las partículas (Pakalns y Farrar, 1977; Frenet, 1981).

En los sistemas acuáticos, los sedimentos contienen la mayor proporción de elementos metálicos (Campbell, 1994). Un sedimento puede ser considerado como una mezcla heterogénea de partículas disímiles. Estas partículas pueden ser transportadas por el cuerpo de agua o bien depositarse en los lechos. Por ello, algunos autores incluyen bajo el nombre de sedimentos tanto el material en suspensión como al que se deposita en los lechos, ya que las partículas en una y otra fase tienen una composición similar (Bradford, 1988; Förstner, 1990). Sin embargo para estudiar los procesos de transporte y transformación es necesario distinguir entre ambos términos.

En cuanto a la composición de las partículas, se puede distinguir una matriz, de origen mineral o biológico, sobre la cual se asocian diversos compuestos de naturaleza inorgánica u orgánica. Entre los compuestos inorgánicos más relevantes pueden citarse arcillas minerales, cuarzo, feldespato, silicatos de aluminio amorfos, carbonatos, óxidos e hidróxidos de hierro y manganeso. Los ácidos húmicos figuran entre los compuestos orgánicos más representativos (Bradford, 1988; Lai, 1988; Förstner, 1990)

Los contaminantes interaccionan con las partículas a través de distintos procesos, tales como la precipitación, disolución, oxidación / reducción, adsorción / desorción, intercambio iónico y complejación (Lai, 1988). Las propiedades físicas de la partículas son las que tienen mayor influencia en los procesos de adsorción, desorción, intercambio iónico transporte y deposición. Entre ellas, el tamaño de partícula es uno de los parámetros principales que gobiernan el transporte de los sedimentos, los procesos

de adsorción y la transferencia de las sustancias químicas entre la fase acuosa y el material particulado (Lai, 1988; Förstner, 1990).

Las superficies de las partículas se encuentran eléctricamente cargadas. Esta propiedad controla en gran medida los procesos de intercambio iónico, adsorción de iones y coagulación de los sedimentos (Lai, 1988).

Los elementos metálicos se asocian con los diversos componentes presentes en las superficies de las partículas. Preferentemente se asocian a través de los óxidos de hierro y manganeso, o también con la materia orgánica de bajo peso molecular, que previamente haya sido adsorbida sobre sustratos arcillosos o de óxidos metálicos. Al menos una parte de dicha materia orgánica, posee grupos carboxílicos o fenólicos disponibles para la unión con los metales (Förstner, 1990).

Si consideramos que frente a cambios en las condiciones ambientales una proporción variable de los contaminantes presentes en los sedimentos puede redisolverse pasando a la fase acuosa soluble o ingresar en la biota; podríamos decir que los sedimentos y el material particulado en suspensión desempeñan un doble rol dentro de los sistemas acuáticos. En primer lugar, como reservorio de numerosos tipos de contaminantes y en segundo, como fuente potencial de liberación de los mismos (Baudo y Muntau, 1990; Landrum y Robbins, 1990).

Entre las partículas de sedimentos puede distinguirse una fase acuosa, que se conoce como agua de poro o agua intersticial. En esta fase se encuentran niveles de contaminantes mucho mayores que los registrados en la columna de agua circundante (Giesy y Hoke, 1990; Landrum y Robbins, 1990).

Por último, resulta interesante mencionar que las especies metálicas solubles son capaces de interactuar con diversas superficies biológicas, sin que obligatoriamente se produzca el ingreso en los organismos. Estas interacciones pueden verificarse a través de las paredes celulares de algas; de microorganismos y en el caso de organismos superiores, a través de membranas branquiales (Mullen et al., 1989; Handy y Eddy, 1990; Simkiss, 1990; Brezonik et al., 1991; Mahan y Holcombe, 1992).

En peces, algunos autores consideran que las superficies corporales y las branquias constituyen los primeros sitios de interacción frente a los iones metálicos. Sin

embargo en relación a las branquias, aún no se ha podido determinar si se trata de un proceso de adsorción o de absorción (Handy y Eddy, 1990).

#### **II. 4. Transformación**

Las sustancias químicas pueden sufrir una serie de transformaciones en el ambiente que conducen a la formación de productos, pudiendo éstos tener una mayor, menor o igual actividad biológica que la sustancia original. Los procesos de transformación pueden ser el resultado de reacciones químicas puras y se reconocen como procesos abióticos, o ser el resultado de la participación de algún organismo vivo, en cuyo caso se los denomina procesos bióticos o de biodegradación (Alexander, 1980; Newman y Unger, 2003).

Los procesos abióticos más relevantes son la hidrólisis y la fotólisis. La hidrólisis es la reacción de una molécula de agua con la sustancia química, como resultado de la misma generalmente se adiciona un grupo hidroxilo y se produce el clivaje de otro sustituyente. La adición del grupo hidroxilo y la fragmentación pueden alterar la actividad biológica de la molécula parental e incrementar su solubilidad en agua (Newman y Unger, 2003). Los factores que afectan a la reacción de hidrólisis son el pH, la temperatura y la adsorción del contaminante a la materia orgánica. Esta última afecta de forma negativa a la hidrólisis, ya que cuanto mayor es la adsorción, menor proporción del contaminante sufrirá hidrólisis (Mahan y Holcombe, 1992). La reacción de hidrólisis usualmente es muy lenta y raramente contribuye en forma significativa a la degradación del contaminante a no ser que la reacción sea catalizada por microorganismos o por la luz (Newman y Unger, 2003).

La reacción de fotólisis es un proceso fotoquímico en el cual la energía lumínica es absorbida por la molécula, resultando en la rotura de enlaces químicos y en la degradación del contaminante. La fotodegradación puede ocurrir por fotólisis directa o indirecta. Durante la fotólisis directa el contaminante en sí mismo es el que absorbe la luz y como consecuencia sufre fragmentación u oxidación. Durante la fotólisis indirecta otras moléculas son las que absorben la luz formando especies reactivas que facilitan la degradación del contaminante. En sistemas naturales la materia orgánica disuelta,

como los ácidos húmicos son buenos absorbentes de luz UV, formando radicales libres que incrementan las tasas de degradación de contaminantes disueltos (Newman y Unger, 2003).

Los procesos de transformación bióticos o biodegradación incluye todas las transformaciones estructurales producidas por acción biológica. Todos los organismos vivos tienen potencial para llevar a cabo procesos de biodegradación (Mahan y Holcombe, 1992), pero las reacciones mediadas por los microorganismos constituyen los procesos más importantes que controlan la degradación del contaminante en el ambiente. Esto se debe a la versatilidad metabólica de los microorganismos, que poseen un sistema enzimático diverso y adaptable, lo cual les permite actuar sobre una variedad de sustratos, incluyendo a aquellas sustancias sintetizadas por el hombre (Newman y Unger, 2003).

La biotransformación incluye procesos de mineralización, detoxificación, activación y transformación. La mineralización ocurre cuando el microorganismo utiliza el contaminante como única fuente de carbono y lo degrada completamente a dióxido de carbono, agua, y sales inorgánicas. La tasa de degradación del contaminante va a estar gobernada por la adaptación de la comunidad microbiana a través de la selección de especies o la inducción de enzimas. La detoxificación incluye las reacciones mediante las cuales se producen metabolitos inocuos a partir de productos tóxicos. Por el contrario, la activación genera productos tóxicos a partir de precursores inocuos. La transformación involucra las reacciones químicas que generan productos de igual toxicidad que el compuesto parental (Mahan y Holcombe, 1992). Por otra parte, los contaminantes metálicos pueden variar en cuanto a su especiación, pero no pueden ser transformados "*per se*" en el ambiente.

Por último, merece destacarse que no todas las sustancias químicas son susceptibles de ser fácil y rápidamente degradadas. Estas moléculas permanecerán inalteradas en los diversos compartimientos y subcompartimientos ambientales, por un cierto período. Esto no quiere decir que la transformación no se llevará a cabo, sino que lo hará en un tiempo considerablemente largo, la vida media de estas sustancias es de más de 40-50 años. Se conoce a estas moléculas como contaminantes persistentes, los cuales constituyen uno de los grupos de mayor relevancia en estudios ecotoxicológicos.

Entre ellas pueden citarse plásticos diversos, algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos, plaguicidas clorados y organohalogenados industriales (Mahan y Holcombe, 1992).

### **III. CONTAMINANTES METÁLICOS**

Los metales son elementos conocidos por su apariencia lustrosa, maleabilidad, ductilidad y conductividad. El término metales pesados fue usado en un principio para definir aquellos elementos metálicos tales como mercurio, plomo, y cadmio que tienen densidades superiores a la del hierro. Este término luego fue aplicado a otros elementos metálicos de importancia ambiental pero sin tener en cuenta su densidad (Newman y Unger, 2003).

Una de las características más destacables que presentan los elementos metálicos es su inmutabilidad, ya que no pueden ser creados ni destruidos. Los metales y metaloides son elementos que se encuentran naturalmente en el ambiente y no son sintetizados por procesos industriales (Goyer y Clarkson, 2001). En este punto cabe preguntarse cuando podemos considerar a los elementos metálicos como contaminantes ambientales.

Un contaminante se define como una sustancia presente en el ambiente en concentraciones mayores que las naturales como resultado de la actividad humana (Manahan, 2000). Así, los elementos metálicos son considerados contaminantes cuando su concentración en el ambiente es alterada con respecto a su distribución natural debido a la actividad humana. Esto puede ocurrir, por ejemplo, como resultado de actividades mineras, refineras, a través de la emisión de efluentes industriales al ambiente y emisiones vehiculares. Tanto las fuentes naturales como antropogénicas de elementos metálicos son importantes contribuyentes de sus emisiones a la atmósfera. Cuando se comparan las emisiones a escala global, elementos tales como el selenio, mercurio y manganeso tienen emisiones más grandes a través de fuentes naturales. Sin embargo a escala regional puede suceder que la fuente antropogénica sea mucho mayor que la natural, así estos elementos metálicos deben ser considerados contaminantes en una escala local. Esto ilustra la importancia de identificar las fuentes,

sumideros y procesos que contribuyen al transporte del contaminante en una escala del sistema en estudio (Newman y Unger, 2003).

La toxicidad de los elementos metálicos es una función del metal en cuestión, la forma química del metal, el nivel y el período de exposición, la toxicocinética y la toxicodinámica. (Kakkar et al., 2005). La utilización de los elementos metálicos por el hombre influye sobre sus efectos potenciales para la salud en al menos dos puntos importantes: primero, sobre el transporte en el ambiente, ya que las actividades humanas contribuyen a su dispersión al aire, agua, suelos y alimento. Segundo, la actividad humana altera la especiación o la forma química de los elementos metálicos (Goyer y Clarkson, 2001).

Algunos elementos metálicos, como por ejemplo el plomo, cadmio, mercurio, níquel, oro y platino, poseen únicamente importancia industrial o económica, pero carecen de función biológica conocida y en general presentan alta toxicidad (Goyer y Clarkson).

En oposición, muchos metales y metaloides, tales como el zinc, cobre, cobalto, hierro, manganeso y selenio, son requeridos para el normal funcionamiento fisiológico en los organismos, ya sea como macronutrientes o elementos traza ( $\leq$  ppm) y estos requerimientos varían considerablemente entre las especies. (Heath, 1995). Muchas enzimas requieren su asociación a elementos metálicos para llevar a cabo correctamente su función. En algunos casos los metales se encuentran firmemente unidos a la estructura proteica, formando parte integral de la misma. En otros, la unión es más débil y el metal cumple un rol de activador. En general, las metaloproteínas desempeñan numerosas funciones vitales para las células, como el transporte de gases (por ejemplo hemoglobina y hemocianina), fotosíntesis (por ejemplo clorofila, plastocianina), transporte de electrones (citocromos, proteínas hierro sulfuradas), etc. (Heath, 1995).

Así, a lo largo de la evolución los organismos debieron ir desarrollando mecanismos que les permitan regular la cantidad de estos elementos en su cuerpo. La regulación se consigue en cierta forma controlando el ingreso de los metales al organismo, así como también los procesos de distribución, utilización, almacenaje y eliminación. Sin embargo, los organismos no son lo suficientemente selectivos como

para impedir, que bajo determinadas circunstancias los metales no esenciales se incorporen a través de las rutas disponibles para los elementos esenciales. El mecanismo de acción tóxica de los metales no esenciales se basa en su fuerte unión con las bases y fosfatos de los ácidos nucleicos, y con los grupos -SH (sulfhidrilos); -NH<sub>2</sub> (aminos); -OH (oxhidrilos); -SS (disulfuro); -COOH (carboxilos) presentes en las biomoléculas; modificando de esta forma su estructura y función. Ellos compiten con los cationes divalentes esenciales, tales como Ca<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup> reemplazándolos en sus roles fisiológicos. Estas interacciones son consecuencia de ciertas analogías químicas entre ambos tipos de elementos, especialmente en su capacidad para formar complejos de coordinación (Beeby, 1991; Pauza et al, 2005).

En la literatura se han propuesto diversas clasificaciones para tratar de relacionar las tendencias de formación de complejos con la estructura atómica de los metales. Una de ellas es la aproximación de Ahrland-Chatt-Davies (ACD), que divide a los iones metálicos en tres categorías, basándose en las configuraciones electrónicas de los orbitales externos.

Los cationes metálicos tipo A carecen de electrones en los orbitales externos, adoptando la configuración de un gas inerte, resultando muy poco polarizables. Estos cationes, en general, forman complejos lábiles, mediante enlaces electrostáticos. Ejemplos de este grupo son el Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>.

Los cationes tipo B tienden a formar complejos estables, mediante uniones covalentes. Su configuración electrónica externa consta de 10 o 12 electrones y son altamente polarizables. Dentro de este grupo encontramos al Cu<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Au<sup>+</sup> y Pd<sup>2+</sup> entre otros.

En la tercera categoría se encuentran la mayoría de los elementos de transición, los cuales presentan de 1 a 9 electrones en sus orbitales externos, careciendo por lo tanto de simetría esférica. No poseen una tendencia general de complejación, algunos presentan comportamiento similar a los cationes tipo A, mientras que otros a los del tipo B. Por esto se los suele considerar como elementos ubicados en la línea de borde entre uno y otro grupo. El Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup> constituyen ejemplos de esta categoría (Beeby, 1991; Brezonik et al., 1991).

### III. 1. Plomo

El plomo es un elemento que si bien no es particularmente abundante (ocupa solo un 0,0013 % de la corteza terrestre) se encuentra distribuido prácticamente en forma global. Ha sido usado desde tiempos remotos y por ende sus efectos tóxicos también han sido reconocidos desde hace varias centurias (Johnson, 1998). Debido a sus propiedades y a sus diversos usos, como por ejemplo en combustibles, baterías, soldaduras, pigmentos, pinturas, cerámicas, cañerías, entre otros. (Newman y Unger, 2003) ha sido difícil, sino imposible, reemplazarlo por otros metales (Johnson, 1998).

Las principales fuentes atmosféricas naturales de plomo en la biósfera son la actividad volcánica y la erosión de rocas, esta última también constituye una fuente en los sistemas acuáticos (Nriagu, 1989). Por otro lado, ciertas actividades humanas constituyen importantes fuentes de emisión de este metal, siendo la más relevante hasta mediados de los años 90 la derivada de los combustibles fósiles (Nriagu y Pacyna, 1988; Pacyna y Pacyna, 2001). Considerando que el plomo se encuentra catalogado como uno de los 10 contaminantes más relevantes por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos; muchos países, a mediados de los 90, impulsaron que se descartara su uso como aditivo para las naftas. Paralelamente, en los países desarrollados se eliminó su uso en la fabricación de latas y otros envases destinados a la industria alimentaria (Johnson, 1998).

Los metales ingresan a los ambientes acuáticos a través de una variedad de fuentes. A nivel mundial se considera que la principal fuente de emisión de plomo en los sistemas acuáticos es la atmosférica (Tabla 1). Las fuentes directas son consideradas de menor relevancia que las correspondientes a las atmosféricas y terrestres (Nriagu y Pacyna, 1988). En países industrializados la emisión directa de plomo a los ambientes acuáticos ha decrecido significativamente debido a la implementación de plantas de tratamiento de efluentes, ya que el plomo se encuentra principalmente asociado al material particulado del agua por lo que es removido de la misma junto con los barros. En un estudio donde se determinó el contenido de varios metales en los barros residuales de las plantas de tratamiento de diversas ciudades de España, se encontró

que en muchos casos los niveles de plomo se correlacionaban positivamente con la mayor densidad de población (García-Delgado et al., 2007).

Tabla 1. Porcentaje mundial de emisión de las diferentes fuentes de plomo a los sistemas acuáticos. (Nriagu y Pacyna, 1988)

	<b>Plomo (%)</b>
Descargas domésticas	4,9
Plantas generadoras de energía	0,5
Minería y fundiciones	5,0
Procesos de manufactura	10,3
Descargas atmosféricas	72,2
Descargas cloacales	6,8

En el ambiente acuático el plomo puede hallarse tanto en forma soluble como asociado a partículas, pero debido a su escasa solubilidad su concentración en agua es baja. Su concentración y toxicidad relativa dependen de la dureza, pH, alcalinidad y contenido de oxígeno disuelto en agua. El contenido medio de plomo en aguas naturales es de hasta  $40 \mu\text{g L}^{-1}$ . El valor máximo para la protección de la vida acuática en agua dulce es de  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  (AGOSBA-OSN-SIHN, 1992).

El plomo existe en varios estados de oxidación (0, +1, +2 y +4). La forma divalente,  $\text{Pb}^{2+}$ , es la especie iónica más estable presente en los sistemas acuáticos y es la forma predominante que ingresa a los organismos acuáticos (OECD, 1993).

En aguas naturales la concentración de plomo generalmente varía entre 0,05 y  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ , mientras que la concentración de plomo disuelto no excede de  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ , debido a su escasa solubilidad (Nussey et al., 2000). La solubilidad del plomo varía de acuerdo a la dureza del agua, siendo de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  en aguas blandas y de  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  en aguas duras (WHO, 1989). En sistemas de agua dulce relativamente no contaminados, predominan especies inorgánicas que presentan muy baja solubilidad. Los principales compuestos que se han identificado son  $\text{PbCO}_3$ ,  $\text{Pb}(\text{OH})_2$ ,  $\text{PbSO}_4$  y  $\text{PbCl}_2$  (Long and Angino, 1977; GESAMP, 1984; Bodek et al., 1988; WHO, 1989; Brezonik et al., 1991; IPCS, 1995).

#### **IV. EFECTOS DE LOS METALES SOBRE LOS ORGANISMOS**

La toxicidad de los contaminantes metálicos es una función no sólo de las propiedades físico químicas del elemento en cuestión, sino también de la susceptibilidad del organismo, la ruta de administración, la dosis, la duración y la frecuencia de la exposición.

De acuerdo a la duración y frecuencia, usualmente se divide a la exposición en cuatro categorías: aguda, subaguda, subcrónica y crónica. La exposición aguda es definida como la exposición a una sustancia química, en una sola aplicación, por menos de 24 horas. En las otras tres categorías la exposición es repetida durante distintos lapsos, según sea la esperanza de vida de cada especie (Timbrell, 2000).

Otro factor que está relacionado con el tiempo y que sirve para la caracterización de la exposición es su frecuencia. Este factor debe estudiarse relacionado con la tasa de eliminación de cada sustancia química. Un agente químico que produce un efecto severo con una única dosis no necesariamente producirá el mismo efecto recibiendo la misma dosis total pero repartida en varios intervalos si el tiempo de vida media de esa sustancia es aproximadamente igual a la frecuencia de dosificación (Eaton y Klaassen, 2001).

En líneas generales se puede establecer una relación entre el efecto de cualquier agente estresante, sea este natural o antropogénico, químico o físico, sobre las respuestas de los organismos. A bajos niveles de estrés el organismo se mantiene en un estado sano debido a mecanismos normales de homeostasis. A niveles superiores de estrés el organismo mantiene el funcionamiento normal mediante mecanismos compensatorios sin un costo metabólico significativo, pero por encima del nivel de compensación se manifestará un estado patológico, en el que el organismo estaría saturando o perdiendo su capacidad de respuesta ante el estrés. Así cuando la perturbación conduce a la alteración de los procesos fisiológicos normales, el organismo es incapaz de reparar el daño y desarrolla un estado patológico irreversible. Por último, si el estrés persiste, la respuesta final del organismo será la muerte (Mason, 1996).

En ecotoxicología cobran fundamental importancia las respuestas o efectos subletales, o sea todas aquellas respuestas que ocurren a niveles de estrés inferiores a los correspondientes a la zona de mortalidad y superiores a los de la zona de homeostasis (Depledge, 1989; Heath, 1995).

En sistemas naturales, la exposición es difícil de determinar debido a la gran diversidad de rutas potenciales de exposición (aire, suelo, agua y alimento), las grandes diferencias en la biodisponibilidad de los contaminantes asociadas a los diferentes ambientes y las diferencias individuales e intraespecíficas en la disposición de los xenobióticos. Todos estos procesos afectan la cantidad de tóxico que ingresa al organismo y alcanza a las moléculas blanco. Los cambios estacionales en el hábitat, alimentación, o en la actividad metabólica pueden modificar la naturaleza y la extensión de la exposición. La exposición ambiental a determinado xenobiótico no puede ser cuantificada midiendo su concentración en el organismo, porque muchos tóxicos no se bioacumulan, pero son metabolizados y en muchos casos los metabolitos son más tóxicos que el componente parental (McCarthy y Shugart, 1990).

Los efectos deletéreos de la exposición a los contaminantes son aún más difíciles de determinar. La naturaleza y magnitud del efecto adverso, puede depender de la magnitud y duración de la exposición, el modo de acción del tóxico, la longitud y el tiempo requerido para manifestar un estado patológico, y la susceptibilidad del organismo. Además, la susceptibilidad es una función de factores individuales e intraespecíficos, tales como la edad, el estado nutricional, el sexo y el impacto acumulativo de otros agentes estresantes químicos, ambientales o fisiológicos. En adición, la atribución de la exposición ambiental sobre determinado efecto suele dificultarse debido a la existencia de un largo período de latencia entre la exposición y la aparición del efecto deletéreo (McCarthy y Shugart, 1990).

Por otro lado, hay que considerar que no todas las poblaciones son igualmente sensibles a una determinada condición de estrés. Así, mientras algunas especies padecen una disminución de su población, otras desarrollan tolerancia o resistencia al agente estresante, llegando incluso a aumentar el número de individuos. El fenómeno de resistencia o tolerancia se puede desarrollar a través de dos mecanismos (Klerks y Levinton, 1989): (1) por adaptación genética, donde la presencia del agente estresante

conduce a una selección natural de la especie más resistentes; o (2) por adaptación o aclimatación fisiológica, en el cual la exposición previa del organismo al agente estresante dispara una serie de procesos metabólicos que desencadenan un cambio permanente en una determinada función biológica y consecuentemente una disminución en la sensibilidad al agente estresante.

#### **IV. 1. Procesos Toxicocinéticos**

En peces, las branquias y el intestino son los sitios primarios para el ingreso de los metales disueltos. El ingreso de los metales esenciales, tales como el cobre, calcio, hierro y zinc, frecuentemente involucra rutas específicas. Esta captación presenta dependencia con la temperatura y en algunos casos, por ejemplo cobre y zinc, cinéticas de saturación consistentes con un ingreso a través de la membrana mediado por un transportador. Los metales no esenciales, no presentan un mecanismo específico de ingreso, sino que utilizan las rutas existentes para los metales esenciales, en el caso del plomo, utiliza los transportadores de calcio (Newman y Unger, 2003).

La absorción de los metales por los organismos acuáticos involucra la transferencia del metal al sistema circulatorio a través de la barrera epitelial de las branquias, sistema digestivo o tegumento (Fig. 4). Esta transferencia incluye tres elementos básicos: (1) captación por la membrana apical, en la interfase con el ambiente; (2) movimiento a través de la célula e interacción con ligandos intracelulares, y (3) eflujo a través de la membrana basolateral en la interfase con el sistema circulatorio (Roesijadi y Robinson, 1994).

El proceso de absorción celular de los metales es un fenómeno de membrana que puede ser asignado a uno o dos esquemas generales, dependiendo si el ingreso está basado en un transporte de membrana o un proceso endocítico de fagocitosis o pinocitosis (Newman y Unger, 2003). Puede esperarse que los metales disueltos ingresen por exposición a las superficies, tales como las branquias. Por otro lado, los metales asociados al material particulado son usualmente ingeridos y posteriormente solubilizados en el intestino. También pueden ser fagocitados y solubilizados en vesículas endocíticas (Roesijadi y Robinson, 1994).

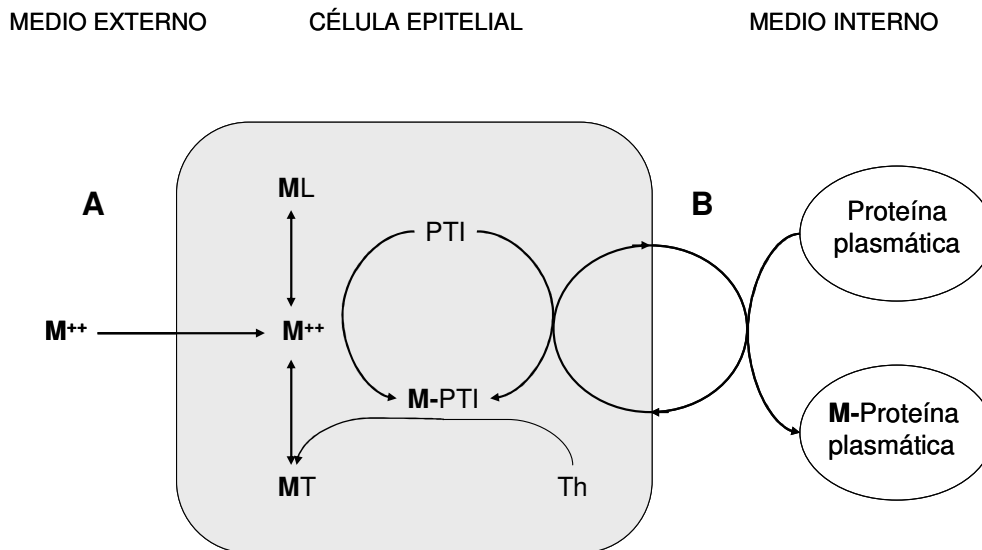


Fig. 4. Modelo de absorción de metales a través de epitelios (de Roesijadi y Robinson, 1994; A, membrana celular apical; B, membrana celular basolateral; PTI, proteína de transporte intracelular; M, metal; ML, complejo metal-ligando no tiónico; MT, metalotioneína; Th, apotioneína).

La afinidad de las branquias por los metales está determinada por el microambiente de la superficie de las branquias, el cual es complejo porque incluye la membrana epitelial así como la capa de mucus compuesta de glicoproteínas, mucopolisacáridos, componentes de bajo peso molecular y agua. Contrariamente a lo esperado, la absorción del metal en la célula branquial es inversamente proporcional a la afinidad de esta superficie para complejar el metal (Heath, 1995).

La tasa de absorción de los metales por las branquias está directamente relacionada con la tasa metabólica de los peces, debido a que cuanto mayor es ésta mayor ha de ser el flujo de agua que pase sobre las branquias. Por ejemplo se ha observado una mayor acumulación de cadmio, cromo y plomo por branquia, bajo condiciones de hipoxia (bajo contenido de  $O_2$  disuelto en agua), donde los peces deben aumentar su tasa respiratoria (Heath, 1995).

El transporte transmural a través de la célula epitelial involucra un ligando intracelular responsable de movilizar al metal desde la membrana apical a la

basolateral. Estos ligandos, que actúan como transportadores moleculares específicos, aún no han sido bien caracterizados. Los primeros estudios postulaban a las metalotioneínas como las proteínas encargadas de esta función en tejido hepático para el zinc, cobre y cadmio. Sin embargo, varios autores rechazaron esta idea considerando que la elevada afinidad de los metales por las metalotioneínas provoca una acumulación de los metales unidos a estas proteínas dentro de la célula intestinal. Por otro lado, la concomitante inducción de metalotioneínas intestinales, el incremento de metales unidos a estas proteínas, el aumento en la concentración de metales en órganos tales como el riñón han sido usados como evidencias de que el complejo metal-metalotioneínas sale del intestino y se transporta hacia órganos internos (Roesijadi y Robinson, 1994).

Estudios más recientes identificaron una proteína intestinal rica en cisteína (PIRC) como la responsable del transporte transmural de Zn en mamíferos; la cual trabajaría en conjunto con las metalotioneínas. Las metalotioneínas compiten con la PIRC por el metal, siendo las primeras más afines; resultando en un retardo del transporte transmural y en un incremento de la retención del metal (Roesijadi y Robinson, 1994). En la Fig. 4 se representó a la PIRC como proteína de transporte intracelular (PTI) para generalizar el modelo de absorción a cualquier superficie epitelial.

Cuando el contaminante ingresó al organismo se vuelve disponible para la biotransformación, transformación biológica de un compuesto químico en otro. La biotransformación involucra los mecanismos de secuestro, distribución, detoxificación, activación y eliminación (Newman y Unger, 2003).

El secuestro de los metales en una forma inmovilizada ocurre a través de varios caminos involucrados en las rutas de captación, transporte, utilización y eliminación. El secuestro en algún compartimiento puede ser un paso temporal en la secuencia de eventos que empiezan con el ingreso y culminan en el sitio de detoxificación, almacenamiento a largo plazo o eliminación (Newman y Unger, 2003).

El posible rol de las metalotioneínas en el transporte transmural ya ha sido discutido anteriormente. Aquí se describirá el rol de estas proteínas en el secuestro de metales y por ende en su detoxificación, el cual ha sido bien establecido. Esta familia de

proteínas de bajo peso molecular actúa en la regulación de metales esenciales como cobre y zinc y en la detoxificación de los no esenciales como cadmio y mercurio. La síntesis de metalotioneínas se induce cuando los organismos son expuestos a estos metales; esta inducción es mayor en los tejidos con gran actividad en la captación, almacenaje y eliminación de metales, tales como intestino, hígado y branquias de peces (Newman y Unger, 2003).

Otro mecanismo de secuestro consiste en la incorporación de metales en una variedad de gránulos en células de tejidos estructurales. Este mecanismo es de gran importancia en invertebrados; con respecto a vertebrados existen reportes de células especializadas que cumplen esta función en tejido conectivo (Newman y Unger, 2003).

El sistema circulatorio es el encargado del transporte de los metales dentro del organismo. El rol dominante en el transporte de metales en sangre de vertebrados lo cumplen las proteínas plasmáticas. Dentro de este grupo, hay algunas que son específicas, como por ejemplo la transferrina para el hierro y la ceruloplasmina para el cobre; y otras que no, como la seroalbúmina para el calcio, níquel, zinc y cadmio (Roesijadi y Robinson, 1994).

Estudios sobre el rol de la sangre en el transporte de metales en peces, son escasos. Así, a falta de información específica, los sistemas de mamíferos pueden servir como modelos para dilucidar el rol de las células sanguíneas en el transporte de metales en peces. Las células sanguíneas de mamíferos pueden acumular metales. Los eritrocitos contienen plomo, zinc y cadmio (Roesijadi y Robinson, 1994). Con respecto al plomo, la mayor parte (90-99.8 %) se encuentra en los eritrocitos. Varios autores han postulado a la hemoglobina como la principal proteína que une al plomo en los eritrocitos; pero estudios recientes mostraron que la proteína que cumple ese rol es la enzima ácido  $\delta$ -aminolevulínico dehidrasa (ALA-D) (Bergdahl et al., 1998). Resulta interesante aclarar que las células sanguíneas de vertebrados no parecen estar involucradas en el transporte de metales, ya que en estas células los metales se encuentran secuestrados y por lo tanto no disponibles para el intercambio con receptores externos. Las proteínas plasmáticas son las que juegan un rol primordial en el transporte de metales y su biodisponibilidad hacia otros tejidos (Hirata et al., 1995).

Si bien la distribución del plomo en los distintos órganos varía considerablemente con la especie de pez estudiada, se puede definir un modelo general, fuertemente relacionado con el metabolismo del calcio (Heath, 1995). La distribución preliminar del plomo por la circulación general ocurre principalmente hacia el hígado y en menor medida riñón, intestino, cerebro y músculo. Posteriormente, en un lapso de días, el plomo es redistribuido y la mayor parte es depositada como una forma inactiva mineralizada en el esqueleto. (Hæger-Aronsen, 1960); siendo éste un importante mecanismo de detoxificación para este metal.

Los organismos acuáticos utilizan diversos mecanismos para eliminar los metales de su cuerpo. Las principales rutas de eliminación son las branquias, la bilis y los sistemas excretores y digestivo. (Newman y Unger, 2003). Por lo general, cuando los metales están presentes en el agua, las branquias y la piel son los tejidos que presentan las tasas más altas de eliminación.

La pérdida de metales vía piel y branquias probablemente involucra al mucus que recubre estas superficies. El material proteico del mucus es continuamente secretado y desprendido de estos tejidos. Una cantidad significativa de plomo y cadmio ha sido registrada en el mucus de la piel de peces inyectados con estos metales. Estos resultados sugieren que parte de los metales que ingresan con la dieta pueden ser excretados por esta vía. Por otro lado, diversos autores han observado que la exposición de peces a concentraciones de zinc, cobre o cadmio en agua estimula el desarrollo de un mayor número de células de cloruro en branquias. Esta respuesta es muy rápida y requiere de unas pocas horas después de la exposición. Estas células que cumplen un importante rol en la osmorregulación también estarían implicadas en la excreción de metales (Heath, 1995).

La excreción de metales por orina en los peces teleósteos ha recibido poca atención. El riñón frecuentemente acumula altas concentraciones de metales, pero esto parece ser meramente una localización para el secuestro de los metales y no necesariamente indicar excreción (Heath, 1995).

Otra ruta para la excreción de metales es a través de las heces. En vertebrados terrestres, los metales inicialmente se acumulan en el hígado y pueden ser excretados en la bilis. En peces, estudios realizados con organismos expuestos a distintos metales

en la dieta o en el agua han mostrado altas concentraciones de por ejemplo, cromo, arsénico y cobre en bilis. La excreción de metales por la bilis no necesariamente implica la eliminación del metal del organismo, ya que por lo menos en mamíferos existe una importante recaptación de los constituyentes de la bilis en el intestino. Este proceso implica la circulación enterohepática, con un consecuente reciclamiento del metal. En peces no se conoce cuan importante puede ser esta circulación enterohepática (Heath, 1995).

Anteriormente se mencionaron los factores que influyen sobre la toxicidad de una determinada sustancia química, pero el determinante de la toxicidad en última instancia es la concentración del tóxico en el sitio o sitios de acción (tejido u órgano blanco). Si bien esta concentración es proporcional a la dosis, para dos sustancias distintas, la misma dosis puede provocar diferentes concentraciones en el mismo blanco. Estos patrones diferenciales son consecuencia de las diferencias en la bioacumulación de los tóxicos (Rozman y Klaassen, 2001). La bioacumulación es la acumulación neta de un contaminante proveniente de distintas fuentes, en, y en algunos casos, sobre un organismo. Es el resultado neto de la captación, distribución, biotransformación y eliminación de un contaminante (Newman y Unger, 2003). Es importante considerar que la acumulación de determinado metal en un órgano específico no es un valor absoluto, sino que usualmente varía con el tiempo (Heath, 1995). La bioacumulación del plomo en los organismos acuáticos ha sido ampliamente reconocida, principalmente en la biota que se alimenta primariamente de material particulado (Tukker et al., 2001). Los tejidos que acumulan mayoritariamente plomo son las branquias, hígado, riñón y huesos (IPCS, 1989).

## **IV. 2. Toxicodinámica**

Correspondientemente al gran número de efectos tóxicos posibles, existen diversos caminos por los cuales llegar a la toxicidad (Fig. 5). El camino más directo se verifica cuando el elemento químico causa toxicidad por el mero hecho de su presencia en un sitio crítico del cuerpo del organismo sin interaccionar con una molécula blanco (camino A). Este camino es seguido, por ejemplo, cuando un agente precipita en los

túbulos renales obstruyendo la formación de orina. El camino más complejo involucra varios pasos. Primero, el tóxico alcanza el blanco o blancos, luego interactúa con una molécula blanco endógena provocando perturbaciones en la función o en la estructura de las células (camino B); como consecuencia se inician mecanismos de reparación, a nivel molecular, celular o tisular. En esta instancia, la toxicidad ocurre cuando la perturbación inducida por el tóxico excede la capacidad de reparación o cuando la misma comienza a fallar (camino C) (Gregus y Klaasen, 2001).

Típicamente se considera que la toxicidad está mediada por la interacción del tóxico con la molécula blanco; por lo tanto para estudiar los mecanismos de toxicidad se deben considerar tres cuestiones (Gregus y Klaasen, 2001): (1) el tipo de reacción entre el tóxico y la molécula blanco, (2) los atributos de la molécula blanco y (3) los efectos del tóxico sobre la molécula blanco.

El tóxico puede interactuar con la molécula blanco a través de uniones no covalentes, covalentes o mediante la sustracción de hidrógenos, transferencia de electrones o bien enzimáticamente. Las uniones no covalentes están típicamente involucradas con las interacciones del tóxico con receptores de membranas, receptores intracelulares, canales iónicos y algunas enzimas. Este tipo de unión usualmente es reversible, debido a que son uniones energéticamente pobres. En contraposición, las uniones covalentes por lo general son irreversibles, alterando a la molécula blanco en forma permanente. Estas uniones comúnmente involucran un tóxico electrofílico y átomos nucleófilos pertenecientes a la molécula blanco, tales como proteínas y ácidos nucleicos (Gregus y Klaasen, 2001). Por ejemplo el plomo se une covalentemente a los grupos tioles de la enzima ALA-D, que es su principal blanco y está involucrada en la síntesis del grupo hemo (Godwin, 2001).

Si bien prácticamente todos los componentes endógenos son blancos potenciales para los tóxicos los más relevantes desde el punto toxicológico son las macromoléculas, tales como los ácidos nucleicos, especialmente el ADN y proteínas (Gregus y Klaasen, 2001).

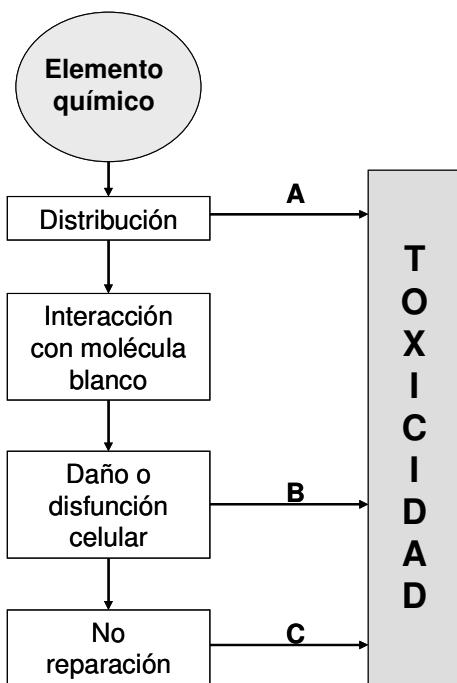


Fig. 5. Estados potenciales en el desarrollo de la toxicidad después de la exposición al elemento químico (de Gregus y Klaassen, 2001)

La reacción del tóxico con la molécula blanco puede causar una disfunción o una destrucción de la misma. La disfunción involucra principalmente la inhibición de la función de la molécula blanco mediada por el tóxico. Por ejemplo, muchos tóxicos provocan la pérdida de función de determinadas proteínas al interactuar con grupos tiol que son esenciales para la actividad catalítica o para el ensamblaje de las mismas con otras macromoléculas. La destrucción de la molécula blanco ocurre cuando el tóxico altera la estructura primaria de la molécula resultando en una fragmentación de la misma (Gregus y Klaassen, 2001).

Con referencia al plomo, existe un importante número de estudios sobre la toxicidad de este metal (Bergdahl, 1997), principalmente relacionados a la exposición ambiental u ocupacional de poblaciones humanas. El grupo de mayor riesgo a los efectos tóxicos del plomo lo constituyen los niños ya que poseen una mayor tasa de captación en relación a su tamaño corporal (Goyer y Clarkson, 2001). La exposición crónica a plomo afecta varios órganos, tales como los sistema nervioso, renal y

hematopoyético. A bajos niveles de exposición afecta la actividad de ciertas enzimas involucradas en la biosíntesis del grupo hemo (U.S. EPA, 1994; Bergdahl, 1997).

En peces, la exposición crónica a niveles subletales de este metal produce principalmente tres efectos: (1) acumulación del metal en el organismo; (2) desarrollo de curvatura espinal, con aumento de la tasa de mortalidad y reducción de la reproducción; y (3) cambios en parámetros hematológicos. Entre estos últimos se puede citar el incremento de la mortalidad de glóbulos rojos maduros, la aceleración de la eritropoyesis, y la inhibición de la enzima ácido delta-aminolevulínico dehidrasa (ALA-D), con la consiguiente reducción del contenido de hemoglobina y de la capacidad de transporte de oxígeno en sangre (Hodson et al, 1978). La toxicidad del plomo depende del estado de vida del pez, del pH y dureza del agua, así como de la presencia de materia orgánica (Nussey et al., 2000).

## **V. BIOMARCADORES**

La necesidad de detectar y valorar el impacto de la polución, sobre la calidad del ambiente, ha llevado a estudiar y desarrollar marcadores moleculares de efecto biológico de los contaminantes sobre los organismos, también llamados biomarcadores.

En un contexto ambiental, los biomarcadores son indicadores sensibles que demuestran la entrada de los tóxicos a los organismos, su distribución dentro de los tejidos y la inducción de un efecto adverso en los sitios de acción. Debido a estos atributos, los biomarcadores medidos en animales provenientes de sitios sospechados de contaminación pueden ser un importante componente informativo dentro de un programa de monitoreo ambiental (van der Oost et al., 2003). Para que un parámetro sea útil como biomarcador es necesario establecer sus niveles basales en condiciones libres de estrés. En el caso particular del estudio de las respuestas biomarcadoras de organismos de un determinado sitio, éstas deben ser comparadas con aquellas encontradas en las mismas especies pero recolectadas en sitios prístinos de "referencia". Idealmente, estos sitios de referencia deben ser ecológicamente idénticos a los sitios evaluados, excepto por la presencia de los contaminantes. La evaluación de los parámetros biomarcadores en organismos provenientes de estos sitios "prístinos"

constituye un importante requisito para disponer de una línea de base con la que se pueden comparar las perturbaciones originadas por la exposición a los diferentes estresantes ambientales (McCarthy y Shugart, 1990).

## **V. 1. Definición y clasificación de los biomarcadores**

Varias definiciones han sido propuestas para el término biomarcador, las cuales generalmente son usadas en un sentido amplio para incluir todas las mediciones que reflejan una interacción entre un sistema biológico y un riesgo potencial, sea éste químico, físico o biológico. Un biomarcador es definido como un cambio en una respuesta biológica (sea molecular, celular, fisiológica o hasta un cambio de comportamiento) la cual puede ser relacionada con la exposición o el efecto tóxico de una sustancia química en el ambiente (Peakall, 1994).

Van Gestel y Van Brummelen (1994) redefinieron los términos “biomarcador”, “bioindicador” e “indicador ecológico” vinculándolos a diferentes niveles de organización biológica. Ellos consideran un biomarcador como cualquier respuesta biológica a un elemento químico ambiental a nivel subindividual, la medición se realiza dentro del organismo o en sus productos (orina, heces, pelo, plumas, etc), indicando una desviación del estado normal que no puede ser detectada en el organismo intacto. Un bioindicador es definido como un organismo que porta información sobre las condiciones ambientales de su hábitat, ya sea por su presencia o ausencia o por su comportamiento; y un indicador ecológico es un parámetro del ecosistema, que describe la estructura y la funcionalidad del ecosistema.

De acuerdo a NRC (1987) y WHO (1993), los biomarcadores pueden ser subdivididos en tres clases:

(1) Biomarcadores de exposición: abarcan la detección y medición de una sustancia exógena o su metabolito o el producto de la interacción entre el xenobiótico y alguna molécula o célula blanco medido dentro de un organismo.

(2) Biomarcadores de efecto: incluyen mediciones bioquímicas, fisiológicas u otras alteraciones en los tejidos o fluidos corporales de un organismo que pueden ser

reconocidos o asociados con un daño potencial o ya establecido para la salud o la muerte.

(3) Biomarcadores de susceptibilidad: indican la habilidad inherente o adquirida por un organismo en respuesta a la exposición a un xenobiótico específico, incluyendo factores genéticos y cambios en los receptores los cuales alteran la susceptibilidad del organismo a la exposición.

La subdivisión de los biomarcadores en la literatura es bastante difusa ya que los biomarcadores de exposición y de efecto son distinguidos según su uso, pero no por una dicotomía inherente (Suter, 1993). Un biomarcador de exposición puede ser usado para confirmar y determinar la exposición de individuos y poblaciones a una sustancia o grupo en particular, proveyendo un vínculo entre la exposición externa y la dosimetría interna. Los biomarcadores de efecto pueden ser usados para documentar alteraciones preclínicas o efectos adversos sobre la salud, debidos a la exposición externa y la absorción de la sustancia química. Los biomarcadores de susceptibilidad ayudan a elucidar las variaciones en el grado de respuestas a la exposición del tóxico observada entre diferentes individuos (van der Oost et al., 2003).

## **V. 2. Tipos de biomarcadores**

Como ya se mencionó en secciones precedentes, es posible analizar el impacto de un tóxico sobre el organismo mediante el empleo de biomarcadores. Los más comúnmente utilizados se describen brevemente a continuación (McCarthy y Shugart, 1990; Newman y Unger, 2003; van der Oost et al., 2003).

- Enzimas de biotransformación: las alteraciones en los niveles de estas enzimas son por lo general uno de los biomarcadores de efecto más sensibles. La exposición a xenobióticos puede inducir o inhibir la cantidad o actividad de estas enzimas. Las enzimas de biotransformación se pueden clasificar en dos grandes grupos: enzimas de fase I y enzimas y cofactores de fase II.

Las enzimas de fase I del metabolismo enmascaran o adicionan grupos funcionales reactivos involucrados en la oxidación, reducción o hidrólisis. Para la mayoría de los xenobióticos las reacciones de fase I son catalizadas por la enzimas

microsomales monooxigenasas (MO), también llamadas sistema de oxidasas de función mixta (OFM); como por ejemplo la familia del citocromo P450, el citocromo b5 y la NADPH citocromo P450 reductasa. La principal acción del sistema OFM es facilitar la excreción de ciertos componentes de naturaleza lipofílica, transformándolos en compuestos más solubles en agua (McCarthy y Shugart, 1990; van der Oost et al., 2003). Algunos xenobióticos son eliminados efectivamente por las reacciones de fase I, pero otros requieren de reacciones de detoxificación de fase II para poder ser eliminados (Newman y Unger, 2003).

Las reacciones de fase II del metabolismo involucran la conjugación del xenobiótico original o su metabolito con ligandos endógenos (Peakall, 1994; van der Oost et al., 2003). Los ligandos endógenos pueden ser derivados de carbohidratos, aminoácidos, glutatión o sulfatos (Newman y Unger, 2003). La adición de estos ligandos polares por las enzimas de fase II facilita la excreción de los xenobióticos. Algunos xenobióticos que poseen grupos funcionales tales como  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$  o  $-\text{NH}_2$ , pueden ser metabolizados directamente por las enzimas de fase II; mientras que otros requieren ser transformados previamente por las enzimas de fase I (van der Oost et al., 2003).

- Parámetros de estrés oxidativo: muchos contaminantes ambientales o sus metabolitos pueden generar estrés oxidativo en la célula. Este tipo de toxicidad asociada al oxígeno involucra los efectos dañinos provocados por la generación de radicales libres u oxiradicales (Timbrell, 2000; Walker et al., 2001; Valavanidis et al., 2006). De particular interés son los productos de la reducción del oxígeno molecular los cuales pueden reaccionar con macromoléculas críticas provocando inactivación enzimática, peroxidación lipídica, daño en el ADN y posteriormente muerte celular (Younes, 1999; Dalle Donne, 2003; van der Oost et al., 2003; Hwang y Kim, 2007). Los organismos hacen frente al estrés oxidativo mediante dos estrategias. Producen antioxidantes, tales como vitamina E, vitamina C,  $\beta$ -caroteno, catecolaminas, glutatión y ácido úrico que reaccionan con los oxiradicales. La segunda estrategia involucra la intervención de enzimas, tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) o glutatión peroxidasa, que transforman los oxiradicales en especies no reactivas (Younes, 1999; Newman y Unger, 2003).

- Productos de biotransformación: los productos de biotransformación involucran metabolitos presentes en fluidos corporales y aductos covalentes formados entre los metabolitos y macromoléculas celulares (proteínas, ADN, ARN). La elevación en los niveles de estos productos es considerada como un biomarcador de exposición y efecto (McCarthy y Shugart, 1990; van der Oost et al., 2003).

- Proteínas de estrés, metalotioneínas y proteínas de resistencia multixenobiótica: Las proteínas de estrés comprenden un grupo abundante de proteínas inducibles involucradas en la protección y reparación de la célula ante situaciones de estrés o condiciones perjudiciales. Grupos especiales de proteínas de estrés son las metalotioneínas, las cuales son inducibles por la presencia de metales esenciales así como no esenciales, y las p-glicoproteínas de resistencia multixenobiótica, las cuales pueden ser inducidas o inhibidas por una gran variedad de agentes químicos (van der Oost et al., 2003).

- Parámetros hematológicos: Típicamente los parámetros hematológicos no son específicos en su respuesta en relación a un agente estresante. Sin embargo proveen información importante con respecto al estado fisiológico general o a la salud del organismo. La detección de enzimas específicas, por ejemplo transaminasas, en la sangre pueden indicar la disrupción de membranas celulares en ciertos órganos (Moss et al., 1986). Los niveles sanguíneos de hormonas esteroideas o proteínas normalmente inducidas por las mismas son indicadores de ciertos efectos reproductivos debidos a disrupción endocrina. Aunque menos específicos, otros parámetros hematológicos utilizados como biomarcadores son por ejemplo el hematocrito, el nivel de hemoglobina o de glucosa (van der Oost et al., 2003).

- Parámetros inmunológicos: un gran número de elementos químicos, tales como PCBs, PHAs, plomo y cadmio; tienen la capacidad de provocar alteraciones en el sistema inmune. Tanto anticuerpos como células involucradas en la inmunidad pueden ser deprimidas por estos elementos (McCarthy y Shugart, 1990; van der Oost et al., 2003).

- Parámetros reproductivos y endocrinos: un gran número de xenobióticos de amplia distribución en el ambiente poseen actividad endocrina (Sumpter, 1995, 1998; Tolar et al., 2001; Matozzo et al., 2007). Estos xenobióticos alteran la capacidad

reproductiva de los organismos, afectando de esta forma la supervivencia de aquellas especies susceptibles a su acción (van der Oost et al., 2003).

- Parámetros neuromusculares: con respecto a la función neural, las enzimas que se utilizan como biomarcadores son las colinesterasas, tanto la acetilcolinesterasa (ACHE) como la butirilcolinesterasa (BCHE). Muchos pesticidas organofosforados y carbamatos tienen la facultad de inhibir la actividad de las colinesterasas (Timbrell, 2000; Walker et al., 2001; van der Oost et al., 2003).

- Parámetros genotóxicos: la exposición de un organismo a elementos químicos genotóxicos puede inducir una cascada de eventos: alteraciones estructurales en el ADN, daño en el ADN y subsecuente expresión de los genes mutados, y desarrollo de un estado patológico como resultado del daño génico. La detección y cuantificación de estos eventos en la secuencia pueden ser empleados como biomarcadores de efecto y de exposición en organismos expuestos a sustancias genotóxicas (McCarthy y Shugart, 1990; Walker et al., 2001; van der Oost et al., 2003).

- Parámetros fisiológicos y morfológicos: la determinación de los efectos adversos o las consecuencias de estos efectos pueden utilizarse como biomarcadores. Los efectos adversos pueden ser detectados por estudios histopatológicos, donde se estudian lesiones, alteraciones y formación de tumores en los tejidos de los organismos (Hinton et al., 1992; Hinton, 1994). Dentro de este grupo de biomarcadores también se incluyen los índices morfométricos, que si bien no son altamente sensibles resultan útiles como biomarcadores iniciales para detectar exposición y efecto u obtener información sobre las reservas energéticas del organismo (Goede y Burton, 1990; Mayer, 1992; van der Oost et al., 2003).

### **V. 3. Ventajas y necesidad del uso de biomarcadores en el monitoreo ambiental**

Los biomarcadores brindan información sobre los efectos biológicos del tóxico que la mera cuantificación de su nivel en el ambiente o en el organismo no puede proporcionar. Las ventajas del uso de biomarcadores en estudios de monitoreo ambiental, con respecto a análisis químicos del ambiente, o datos de bioensayos, se

enumeran a continuación (McCarthy y Shugart, 1990; Peakall, 1992; Livingstone, 1993; van der Oost et al., 2003).

- Los biomarcadores proveen una medida temporal y espacialmente integrada de la biodisponibilidad del contaminante, en oposición a la información brindada por el análisis químico donde ciertos cambios observados pueden ser el resultado de eventos climáticos o descargas discontinuas desde plantas industriales.

- Pueden atribuir la exposición y riesgo debido a un determinado contaminante ambiental, por ejemplo se puede establecer causalidad a partir de las respuestas específicas y los mecanismos comprendidos de las consecuencias deletéreas sobre el organismo.

- Su aplicación en especies de diferentes hábitats, o en diferentes niveles tróficos, pueden ayudar a establecer la importancia de las diferentes rutas de exposición. Esto puede ayudar a determinar prioridades en un esquema de monitoreo y sugerir estrategias para la intervención o remediación.

- Los bioensayos de toxicidad pueden proveer información sobre las toxicidades relativas de sustancias químicas específicas o efluentes, pero su extrapolación a la situación de campo es muy dificultosa por muchas razones, incluyendo la especiación química, los efectos de absorción y captación, acumulación a través de la cadena trófica y los efectos subletales y los modos de acción del tóxico no son detectados en ensayos corto plazo.

- Proveen evidencia de la exposición a compuestos que no son bioacumulados o son rápidamente metabolizados o eliminados, tales como pesticidas organofosforados o hidrocarburos poliaromáticos. Los biomarcadores proveen información integrada de la acción tóxica del compuesto original así como de sus metabolitos tóxicos.

- Integran interacciones toxicológicas y toxicocinéticas resultantes de la exposición a mezclas complejas de contaminantes. Interacciones directas e indirectas de múltiples contaminantes sobre la captación y la distribución interna de sustancias químicas, así como el sinergismo y antagonismo de la acción tóxica, son integrados en el organismo. Los biomarcadores expresan los efectos acumulativos de la interacción de los tóxicos en moléculas o células blanco.

- Las respuestas al estrés dentro de un sistema biológico siguen un orden secuencial, como se muestra en la Fig. 6. Los biomarcadores a niveles moleculares o bioquímicos responden rápidamente a cambios en la exposición al contaminante, mientras que para observar cambios a nivel de poblaciones o comunidades es necesario un largo período de latencia. Las rápidas respuestas a niveles bioquímicos pueden servir para predecir a corto plazo el efecto ecológico a largo plazo.

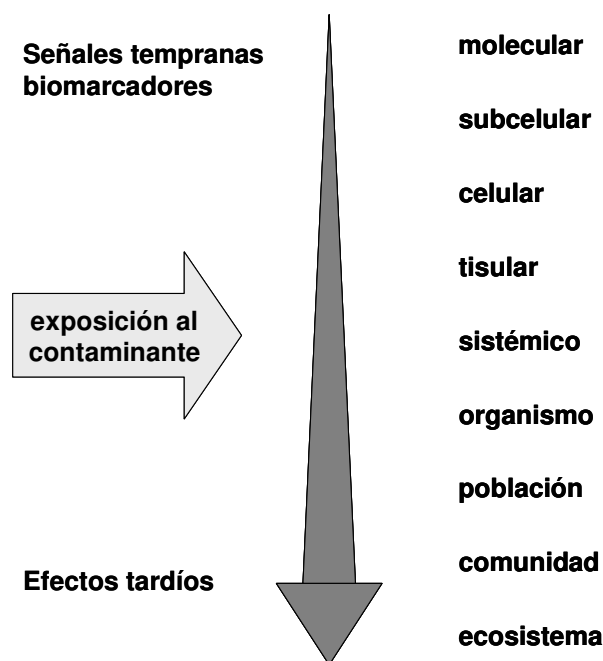


Fig. 6. Esquema del orden secuencial en las respuestas a la exposición de un contaminante dentro de un sistema biológico (de van der Oost et al., 2003)

En función de evaluar objetivamente la solidez o la debilidad de distintos biomarcadores van der Oost et al. (2003) propusieron seis criterios que abarcan la información más importante que deberían proveer o ser establecida por cada parámetro candidato a biomarcador.

- El ensayo para cuantificar el biomarcador debe ser confiable, relativamente barato y rápido de ejecutar.
- La respuesta del biomarcador debe ser sensible a la exposición y/o efecto del tóxico para poder servir como un parámetro temprano de advertencia.

- Una línea de base de datos del biomarcador debe ser definida para poder distinguir entre variabilidad natural (ruido) y estrés inducido por el contaminante (señal).
- El impacto de factores interferentes con la respuesta del biomarcador debe estar bien establecido.
- El mecanismo fundamental de la relación entre la respuesta del biomarcador y la exposición al tóxico (dosis y tiempo) debe ser establecido.
- La significancia toxicológica del biomarcador debe ser establecida; por ejemplo la relación entre su respuesta y el impacto a largo plazo en el organismo.

En adición a estos criterios los autores sugieren que los biomarcadores deberían ser preferentemente no invasivos o no destructivos, para lograr o facilitar mediante el monitoreo de los efectos de la contaminación la protección de la especie.

#### **V. 4. Usos y estrategias de la aplicación de biomarcadores en monitoreo ambiental**

Las aplicaciones potenciales de los biomarcadores incluyen programas rutinarios de monitoreo a largo plazo, valoración de riesgo en sitios de descarga específicos, sustento para el manejo de control y estándares regulatorios ambientales y el monitoreo de acciones de remediación efectivas (McCarthy y Shugart, 1990). Los biomarcadores no deberían ser usados aislados de otras mediciones; sino como parte de un programa integrado de monitoreo que incluya análisis químicos, biomarcadores generales de la condición del organismo y biomarcadores específicos del efecto del contaminante. Programas menos complejos con pocos biomarcadores podrían ser usados en monitoreo de rutina, aplicándose un mayor número cuando se identifica un problema ambiental y se requieren estudios más detallados (Livingstone, 1993).

En todas estas aplicaciones el monitoreo basado en biomarcadores necesita incluir no sólo el sitio probablemente contaminado sino también un sitio de referencia ecológicamente comparable y sin fuentes de contaminación reconocidas. Así el biomarcador medido en especies del sitio prístino provee un nivel de referencia para comparar la respuesta observada en las especies del sitio sospechosamente contaminado (McCarthy y Shugart, 1990).

Comúnmente el objetivo de los estudios sobre las respuestas biológicas al estrés era predecir el cambio en las poblaciones y comunidades a partir de los cambios observados a nivel molecular, celular o fisiológico. En los últimos años se le dio menos énfasis a esta perspectiva y más importancia a los cambios en sí mismo en el organismo. Así, un punto de vista razonablemente generalizado considera que el cambio en un biomarcador relacionado a un contaminante es razón suficiente en sí misma para merecer atención y acción (van der Oost et al., 2003).

### **V. 5. Limitaciones del uso de biomarcadores en el biomonitoreo ambiental**

La sucesiva implementación de biomarcadores en programas de monitoreo ambiental requiere un buen entendimiento de los mecanismos fundamentales de las respuestas. Los biomarcadores son herramientas poderosas en el monitoreo ambiental porque integran un amplio rango de factores ecológicos, ambientales y toxicológicos que controlan y modulan la exposición así como el efecto de los contaminantes ambientales (van der Oost et al., 2003). Sin embargo estos mismos factores pueden complicar la interpretación o el significado de la respuesta del biomarcador ya que no siempre pueden ser anticipados. Muchas variables no relacionadas con la contaminación provocan un impacto adicional sobre varios sistemas enzimáticos, interfiriendo así con la respuesta del biomarcador cuando las condiciones experimentales no están completamente estandarizadas o controladas. Ejemplos de tales factores son la salud de los organismos, el sexo, la edad, el estado nutricional, la actividad metabólica, el comportamiento migratorio, el estado reproductivo y de desarrollo, la densidad poblacional, y también factores tales como la estación del año, la temperatura ambiental, la heterogeneidad de la polución ambiental, entre otros (McCarthy y Shugart, 1990; Livingstone, 1993).

Otra limitación para el uso de biomarcadores es que la relación entre la respuesta del biomarcador y el efecto a nivel poblacional aún no está bien establecida. Los ecosistemas responden en conjunto a las influencias naturales y antropogénicas que actúan sobre él. En adición, varias sustancias pueden afectar al mismo biomarcador, así muchas respuestas de biomarcadores no son específicas para una

sustancia individual. Su comportamiento dosis - respuesta frecuentemente no es predecible debido a una inadecuada investigación de base. Para especies móviles tales como peces, la duración de la exposición es incierta. Por esto resulta importante ser muy cauteloso al definir las condiciones de referencia. A fin de evitar interferencias potenciales es necesario ser muy cuidadoso en el muestreo y en el procesamiento de las muestras (van ser Oost et al., 2003).

## **VI. Acido $\delta$ -aminolevulínico dehidrasa (ALA-D)**

La enzima ácido  $\delta$ -aminolevulínico dehidrasa (ALA-D; E. C. 4. 2.1.24), también llamada porfobilinógeno sintasa, es la segunda enzima en la vía biosintética del hemo (Fig. 7). Cataliza la condensación asimétrica de dos moléculas de ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA) para formar el monopirrol no saturado heterocíclico porfobilinógeno (PBG). El ALA y el PBG son los precursores biosintéticos de todas las porfirinas, como el hemo y la clorofila (Jaffe 2004), moléculas que juegan un importante rol en el metabolismo aeróbico y que explica la distribución ubicua de ALA-D en virtualmente todos los phylla (Rocha et al., 2004). Esta enzima ha sido detectada por primera vez en hemolizados de eritrocitos de aves (Dresel et al, 1953; Shemin et al, 1953) y *Chrorella* (Granick, 1954); es quizás la enzima del camino del hemo que más ha sido estudiada. Se encuentra en el citoplasma de todas las células, presentando mayor actividad en eritrocitos, hígado y riñón (Abdulla et al, 1978).

La enzima ha sido purificada a partir de una variedad de organismos, como bacterias, plantas, aves y mamíferos. La base de datos actual posee la secuencia de ALA-D correspondiente a 130 especies diferentes. Tanto su secuencia como estructura están altamente conservadas. Su estructura cristalina muestra que se trata de una proteína oligomérica formada por ocho subunidades idénticas (Fig. 8). Con excepción de los aminoácidos que interaccionan directamente con el zinc catalítico, los cuales están presentes sólo en algunas especies y algunos aminoácidos del sitio activo; los aminoácidos que forman parte del sitio activo son filogenéticamente invariables. A pesar de esta conservación en la secuencia existe una dicotomía en cuanto a la utilización de

iones metálicos. Como consecuencia de esto el ALA-D presenta una dicotomía filogenético en relación a su mecanismo de reacción (Jaffe, 2003, 2004).

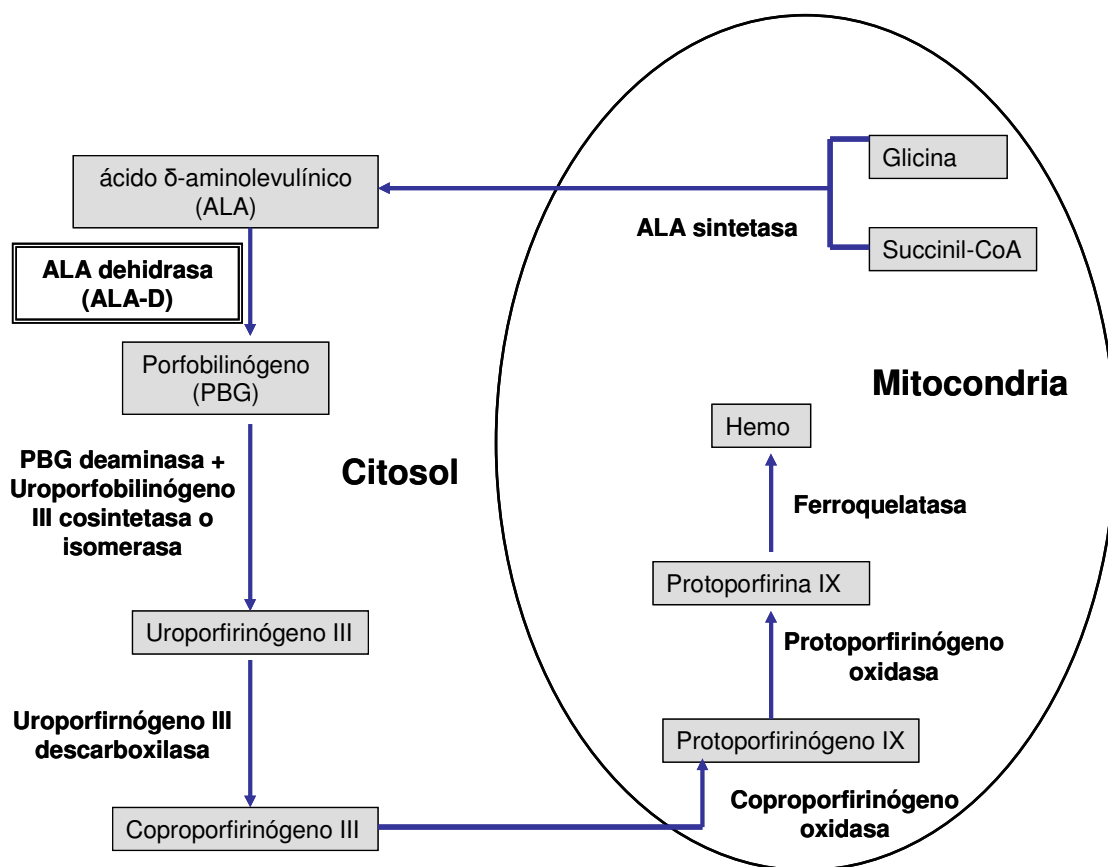


Fig. 7. Esquema de la vía biosintética del grupo hemo.

Una característica distintiva de esta enzima es la existencia de una inusual diversidad en el uso de metales iónicos como cofactores, participando del sitio activo o del sitio alostérico. Los metales del sitio activo varían entre zinc, magnesio y/o potasio. Parte de esta diversidad puede ser atribuida a la presencia o ausencia de una secuencia rica en cisteínas en el sitio de unión al zinc. Las especies que poseen un ALA-D con un sitio activo esencial para el zinc, son animales (metazoa), hongos, arqueobacterias y algunas bacterias. Este sitio es crucial para la unión y reactividad de la segunda molécula de ALA. De aquellas especies que no presentan un sitio de unión

al zinc, algunas parecen usar un catión monovalente en el sitio activo, otras pueden requerir magnesio, mientras que otras no usan ningún ión metálico (Jaffe, 2004). Por otro lado, la variación en la unión del metal al sitio alostérico es menos compleja. Aquellas ALA-D que poseen un sitio alostérico unen magnesio en este sitio, mientras que otras ALA-D no poseen un lugar de unión a ningún metal en este sitio (Jaffe, 2003).

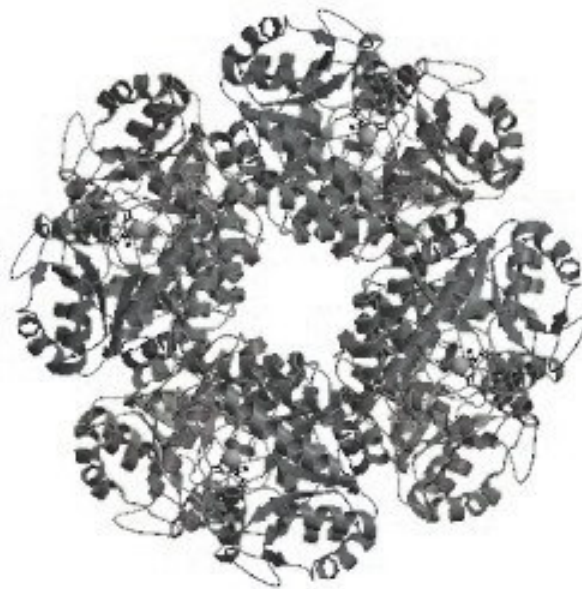


Fig. 8. Estructura cristalina nativa del ALA-D humana eritrocitaria (Mills-Davies N.L., Thompson D., Cooper J.B., Shoolingin-Jordan, P.M.)

Basándose en las diferencias descritas anteriormente Jaffe (2003) propone una clasificación del ALA-D en cuatro categorías:

- (1) Sitio activo con Zn y sitio alostérico con Mg
- (2) Sitio activo con Zn y ausencia de sitio alostérico con Mg
- (3) Sitio activo sin Zn y sitio alostérico con Mg
- (4) Sitio activo sin Zn y ausencia de sitio alostérico con Mg.

La enzima de los Metazoa se encuentra en la segunda categoría. Esta enzima posee además un sitio de unión para un segundo átomo de Zn, el cual se encuentra cerca del sitio activo, pero no es esencial para su actividad. (Conner y Fowler, 1994). Es una proteína termoestable de PM 280.000. Contiene 28 grupos  $-SH$ , consecuentemente pierde actividad por exposición al aire, debido a la oxidación de los

grupos SH esenciales, por bloqueo de los grupos SH con reactivos clásicos, diversos metales pesados, o tratamiento con EDTA (Farina et al., 2003). Presentan un  $K_m$  aparente para el ALA de  $1-4 \times 10^{-4}$  M y un rango de pH óptimo de 6,3 a 7,1 (Conner y Fowler, 1994).

Salvo algunas excepciones (Battle y Magnin, 1988), en las cuales el ALA-D funcionaría como enzima regulatoria, en la mayoría de los tejidos la actividad de esta enzima es muy superior a la del ácido  $\delta$ -aminolevulínico sintetasa (ALA-S) y se considera que no desempeña ningún papel en el control de la síntesis del hemo.

La enzima ALA-D experimenta cambios de actividad durante el desarrollo animal, siendo significativamente elevada en el hígado fetal (Doyle et al, 1969; Weissberg et al, 1974), disminuye varias veces después del nacimiento y luego aumenta hasta llegar al nivel del adulto en unas pocas semanas (Doyle et al, 1969). El rango de variabilidad de la actividad enzimática del ALA-D sanguínea muestra una variación de 3-4 veces para los cambios de actividad interindividual en la población humana (Sassa et al, 1973) y en animales (Sassa et al, 1977).

El ALA-D humana es una enzima polimórfica codificada por un gen simple con dos alelos ALA-D1 y ALA-D2 y tres fenotipos identificados (ALA-D 1-1, ALA-D 1-2 y ALA-D 2-2) (Battistuzzi et al, 1981; Petrucci et al., 1982). Numerosos estudios realizados en humanos (Wetmur, 1994; Smith et al. 1995; Schwartz et al. 1995, 2000; Sithisarakul et al. 1997; Björkman et al. 2000) sugieren que la concentración de plomo en sangre está asociada no sólo a los niveles de exposición ambiental sino también al polimorfismo del ALA-D, que modifica la toxicocinética del plomo. En individuos expuestos a plomo, el porcentaje de este metal unido a la enzima ALA-D fue mayor en individuos portadores del alelo ALA-D2 que en homocigotas para el alelo ALA-D1. Sin embargo, este polimorfismo no condiciona la actividad basal del ALA-D (Sithisarakul et al, 1997).

La base de datos de la secuencia del ALA-D no presenta registros sobre especies de peces y además existen muy pocos trabajos (Rodrigues et al., 1989; Conner y Fowler, 1994; Nakagawa K. et al., 1995; Alves Costa et al., 2007) que caractericen bioquímicamente a la enzima. Los estudios realizados por Conner y Fowler (1994) sobre el ALA-D hepática de *Ictalurus punctatus* mostraron que ésta difiere de la

de mamíferos en algunos aspectos importantes, como por ejemplo menor sensibilidad al plomo, menor  $K_m$  aparente, mayor resistencia a la temperatura y el no requerimiento de zinc como cofactor. Los resultados obtenidos en estos estudios sugieren que existen diferencias estructurales entre el ALA-D de peces y mamíferos.

## **VI. 1. Interacción de metales con la enzima ALA-D y su uso como biomarcador**

Como se dijo anteriormente, el ALA-D de animales es una enzima zinc dependiente. A diferencia de otras proteínas que unen zinc, el ALA-D presenta una inusual secuencia en el sitio de unión a este metal (Godwin, 2001). La presencia en este sitio de tres cisteínas unidas a un lado del ión metálico convierte a esta enzima en un blanco primario para la inhibición del plomo, para el cual presenta una inusual preferencia estereoquímica (Jaffe et al., 2001; Shimoni-Livny et al., 1998). Su afinidad por el plomo es 25 veces superior a la del zinc, y estos metales parecen competir por el mismo sitio de unión (Bergdahl et al., 1998; Rodrigues et al., 1989). Estudios realizados en sangre de humanos determinaron que el ALA-D es la principal proteína de unión a plomo en ese tejido (Bergdahl et al., 1997)

La estructura de la enzima unida al plomo es esencialmente idéntica a la forma unida a zinc, la inhibición del plomo es del tipo no competitivo (Eskine et al., 1997). Estudios realizados en humanos mostraron que el  $K_m$  aparente ( $K_i$ ) para la inhibición por plomo en el orden de  $0,5 \mu\text{M}$  a  $10 \mu\text{g dl}^{-1}$  de sangre. Así, una concentración de plomo sanguínea de  $10 \mu\text{g dl}^{-1}$  puede producir un 50% de reducción en la actividad del ALA-D.

Numerosos estudios *in vitro* o de dosificación han demostrado la capacidad de muchos metales y agentes oxidantes de los grupos SH de inhibir la actividad de la enzima ALA-D en diversos tejidos (Gibson et al., 1955; Nakemura et al. 1975; Sassa, 1978, Perottoni et al., 2004); pero sólo el plomo provoca la inhibición cuando el organismo es expuesto ambientalmente a este metal (Hodson et al., 1977).

De acuerdo con Peakall (1994) la inhibición de la actividad del ALA-D como biomarcador fue inicialmente investigada por Herbing et al. (1970) con el fin de

determinar exposición ambiental a plomo en humanos. A partir de entonces la determinación de la actividad de la enzima fue utilizada rutinariamente en análisis clínicos toxicológicos.

Su especificidad como biomarcador de exposición a plomo es considerablemente elevada. Por esta razón el ALA-D ha sido ampliamente usada como un indicador de exposición a plomo en humanos (Granick et al., 1972; Secchi et al., 1974) aves (Work et al., 1996), anfibios (Peri et al., 1998), peces (Hodson et al., 1977; Christensen et al. 1977; Larsson et al., 1985; Dwyer et al., 1988; Schmitt et al., 1984, 1993; Nakagawa H. et al., 1995a, 1995b, 1997a) e invertebrados (Verrengia Guerrero et al., 1997), entre otros. La enzima puede presentar una inhibición máxima mucho antes de que otros síntomas de intoxicación sean perceptibles (Mayer et al., 1992).

La alta sensibilidad del ALA-D como biomarcador específico de plomo ha abierto la posibilidad de explorar el uso de la actividad de la enzima en bacterias como un biosensor de la biodisponibilidad de plomo en ambientes acuáticos (Ogunseitan et al., 2000).

Sin embargo, recientemente se ha encontrado que el cobre causó un descenso significativo en la actividad del ALA-D en tejido hepático, muscular y renal de *Leporinus obtusidens* expuestos crónicamente a concentraciones subletales de este metal (Gioda et al., 2007). Similarmente, el zinc inhibió la actividad del ALA-D en tejido hepático, renal y nervioso (Gioda et al., 2007).

Aparentemente, la sensibilidad del ALA-D a metales distintos al plomo podría depender de la identidad de los cofactores metálicos de la enzima (Tanaka et al., 1995; Ogunseitan et al., 1999, 2000) y/o de la afinidad de la enzima para unir plomo (Wetmur, 1994).

## **VI. 2. Reactivación de la actividad de la enzima ALA-D**

La actividad de la enzima ALA-D presenta una gran variabilidad. Por esto es importante poder distinguir entre una inhibición y un bajo nivel de actividad normal. La actividad de la enzima puede reactivarse mediante el empleo de agentes protectores de

los grupos –SH, tales como glutatión, cisteína, ditioneitol (DTT), o bien mediante  $Zn^{2+}$  (Yagminas y Villeneuve, 1987).

En el caso particular del plomo; ha sido demostrado que el  $Zn^{2+}$  y/o DTT *in vitro* son capaces de reactivar la inhibición de la enzima ALA-D producida por plomo (Goulart et al., 2001). El efecto del  $Zn^{2+}$  sobre la actividad del ALA-D ha sido estudiado tanto en mamíferos como en peces, observándose variaciones de la actividad de la enzima, sólo a concentraciones de  $Zn^{2+}$  cercanas a la letal (Meredith et al., 1979; Hodson et al., 1977). Por otro lado, numerosos estudios *in vitro* y/o *in vivo*, han demostrado que existe un efecto antagónico del  $Zn^{2+}$  sobre la inhibición del ALA-D por plomo (Finelli et al., 1974; Abdula et al., 1978; Meredith et al., 1979; Schmitt et al., 1984, 1993; Yagminas y Villeneuve, 1987; Woods, 1995; Bergdahl et al., 1998; Martin et al., 1998; Santos et al., 1999; Goulart et al., 2001; Nogueira et al., 2003). El mecanismo propuesto es un desplazamiento estequiométrico del Pb por el  $Zn^{2+}$ .

Los niveles de actividad reactivada se consideran que representan la máxima actividad de la enzima. Por esto, la relación entre la actividad no reactivada y reactivada de la actividad del ALA-D ha sido validada como índice de exposición a plomo en mamíferos (Granick et al., 1973; Finelli et al., 1974; Fujita et al., 1981, 1982); mientras que en peces, estudios previos realizados muestran resultados poco consistentes, tanto en sangre (Hodson et al., 1977; Krajnovic-Ozretic y Ozretic, 1980; Rodríguez et al., 1989) como en hígado (Conner y Fowler 1994).

## **VII. Organismos seleccionados para estudios de monitoreo ambiental**

Hasta aquí se han discutido las principales ventajas y limitaciones en el uso de los biomarcadores más comúnmente usados en estudios de campo. Sin embargo, al considerar la selección apropiada del biomarcador es igualmente importante la elección del organismo con el cual se va a trabajar.

Idealmente, una especie útil para este tipo de estudios de campo, debería reunir las siguientes características (Lehtonen et al., 2006):

- Ser relativamente abundante en el área de estudio y estar disponible durante todo el año.

- La especie debería ser preferentemente sésil o sedentaria y fácilmente identificable.
- La especie debe ser indicativa de bioacumulación y/o biomagnificación.
- En el mismo tejido debería ser posible realizar análisis de distintos biomarcadores.

Por varias razones las especies de peces han sido utilizadas en estudios de monitoreo de campo (van der Oost et al., 2003). Éstas se encuentran virtualmente presentes en todos los ambientes acuáticos y juegan un importante rol en la cadena alimenticia como transportadores de energía desde los niveles tróficos inferiores a los superiores. Así, el entendimiento de la captación, comportamiento y respuesta de los peces a la exposición a los contaminantes tiene una alta relevancia ecológica. Dejando de lado sus limitaciones, como por ejemplo su alta movilidad, los peces son considerados generalmente como los organismos más factibles en estudios de monitoreo ambiental en ambientes acuáticos (van der Oost et al., 2003).

## **VII. 1. Breve caracterización de la especies utilizadas en este trabajo**

### **VII. 1. 1. *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847)**

*Prochilodus lineatus* (Fig. 9) es una especie de Sudamérica de la Clase Actinoptérgos, Orden Characiformes. Su nombre común en Argentina es sábalo o sábalo jetón.

Se distribuye en los ríos Paraná, Uruguay y de la Plata. El límite norte es la nacimiento del río Uruguay (Brasil) y el sur en la cuenca del río Salado en la provincia de Buenos Aires (Argentina). En nuestro país lo encontramos en las cuencas de los ríos Bermejo (Salta), Pilcomayo (Formosa) y Salí (Tucumán); en los ríos Paraná, Uruguay, de la Plata, Juramento (Salta), Dulce (Santiago del Estero) y Salado (Buenos Aires) y ocasionalmente en la laguna de Chascomús (Sverlij et. al., 1993).

*P. lineatus* llega a medir hasta 60 cm. de longitud total y a pesar más de 6 Kg. Tiene cuerpo largo y comprimido, gris-verdoso (aclarado en el vientre), con escamas amarillentas. Su boca es circular, bordeada por labios gruesos, y se proyecta desde el

frente. *P. lineatus* es la especie más abundante de la cuenca del Plata, llegando a constituir más del 50% de la biomasa de peces de gran porte (Oldani, 1990). Los adultos y juveniles de esta especie son iliófagos estrictos, alimentándose únicamente de los detritos contenidos en los sedimentos de los cuerpos de agua. De este modo juegan un importante rol en el proceso de la transformación de la materia orgánica, que se canaliza a niveles tróficos superiores a través de la predación sobre larvas, juveniles y adultos de la especie. Peces depredadores, como el surubí (*Pseudoplatystoma sp.*) y el dorado (*Salminus maxillosus*) dependen de los enormes cardúmenes de sábalo para su subsistencia (Baigún et al., 2003). Por otro lado, al ser una especie iliófaga es capaz de incorporar contaminantes presentes no sólo en la columna de agua sino también en los sedimentos. Por esta razón ha sido considerado como un buen organismo bioindicador para determinar simultáneamente la calidad del agua y de los sedimentos (Almeida et al., 2005; Santos et al., 2005; Camargo et al., 2006).



Fig. 9. *Prochilodus lineatus*

Otro aspecto importante de esta especie son las migraciones periódicas que realiza, constituyendo uno de los fenómenos más complejos que tienen lugar en el ecosistema y que fueron motivo de estudio por diversos autores (Bonetto A. y Pignalberi, 1964; Bonetto A. et al., 1971; López, 1972; Bayley, 1973; Godoy, 1975; Bonetto A., 1976; Bonetto A. et al., 1981, Bonetto C. et al., 1981; Oldani y Oliveros, 1984; Tablado y Oldani, 1984; Delfino y Baigún, 1985; Welcomme, 1985, Lowwe-McConnell,

1987). Dichos autores observaron que las migraciones ascendentes, en distintos lugares de la cuenca, se producen durante casi todo el año, en el período de aguas en creciente. En cuanto a la magnitud de estos desplazamientos los distintos autores la sitúan en el orden de 200 a 600 Km. (Oldani, 1990).

La migración aguas arriba tiene fines reproductivos, los sábalo se desplazan hasta llegar a las planicies de inundación típicas del Río Paraná y otros ríos de la cuenca. Si bien la reproducción y el desove tienen lugar en el cauce de los ríos; los huevos, larvas y peces pequeños derivan aguas abajo, hacia las aguas someras de las lagunas de inundación, donde encuentran refugio y comida (Oldani, 1990). Allí permanecen aproximadamente entre 1 y 2 años, luego de los cuales vuelven al cauce principal del río. Terminado el período reproductivo, los sábalo migran río abajo (Sverlij et. al., 1993).

Fuera de la época de reproducción frecuentan aguas tranquilas o remansos de los ríos con fondo blando y fangoso. Abundan en la región litoral o costera y en la desembocadura de los tributarios (Sverlij et. al., 1993).

En el río de la Plata, bajo Uruguay y bajo Paraná, a diferencia de lo que ocurre en otras zonas de la cuenca, las variaciones del nivel hidrométrico no son importantes desencadenantes de las migraciones. Aparentemente la temperatura del agua es el principal estímulo que desencadena las migraciones. De esta forma, en otoño se producirían desplazamientos de sábalo hacia el tramo medio del Paraná manifestándose en invierno el mayor número de ejemplares en esta zona (Oldani, 1990). Durante la temporada reproductiva, que se extiende de octubre a marzo (primavera-verano) se los encuentra en los valles de inundación donde desovan y luego emprenden el regreso hacia el río de la Plata y Uruguay (Sverlij et. al., 1993).

Históricamente, el sábalo ha representado la especie blanco de mayor interés debido a su extracción con fines de consumo e industriales (harina, aceite y guano de pescado). Su particular hábito alimenticio lo hace difícil de pescar con anzuelo, por lo cual se emplean distintos tipos de redes para su captura (red de arrastre, trasmallo, tres telas, etc.). Las sabalerías del Río de la Plata trabajaban con redes de arrastre de playa de hasta 800 m de longitud caladas con botes y arrastradas mediante caballos. Esta red se utilizaba en aguas someras con profundidades de hasta 3 metros. Estas pesquerías

tuvieron su apogeo en la década del 40, con capturas nominales de hasta 11.100 toneladas, procesadas por plantas industrializadoras de harina de pescado (Baigún et al., 2003).

La situación actual de *P. lineatus* en el Río de la Plata es crítica. A los problemas ligados a la pesca indiscriminada se suma el de la contaminación, situación descrita anteriormente cuando se describió la zona de estudio. Así, el sábalo por su hábito alimenticio constituye una de las especies más afectadas. Se ha encontrado que los ejemplares capturados en esta zona tienen en el músculo altas concentraciones de metales pesados, hidrocarburos y contaminantes orgánicos persistentes (en particular PCBs), que en algunos casos superan los valores máximos recomendados para el consumo humano (Villar et al., 2001; Aizpún et al., 2003; Baigún et al., 2003; Colombo et al., 2007a, 2007b).

#### VII. 1. 2. *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758)

*Cyprinus carpio* (Fig.10) pertenece a la Clase Actinopterygios, Orden Cypriniformes, Familia Cyprinidae. Su nombre común en Argentina es carpa común (Hecker, 1993).



Fig. 10. *Cyprinus carpio*

Originaria de Eurasia, fue introducida en Argentina a principios del siglo XX por su importancia en acuicultura y en la industria pesquera, tanto deportiva como comercial (Balon, 1995; Iwaszkiw, 2001). Desde entonces hasta la fecha su distribución se encuentra en amplia expansión; siendo la única especie exótica en el río de La Plata lo suficientemente abundante como para constituir un componente significativo de la fauna ictícola de esta zona (Baigún et. al., 2003). Su distribución en nuestro país abarca el Río de la Plata; Río Paraná; Río Uruguay; Cuenca del Río Salado; Laguna San Ramón de Bragado; Bajo Vidaña al noroeste de Trenque Lauquen; Laguna El Hinojo (Trenque Lauquen) (Almirón et. al., 1992; Colautti, 1997).

Es una especie muy tolerante a una gran variedad de condiciones. Se la encuentra en climas templados, con un rango de temperatura de 14 – 35 °C; principalmente en cuerpos de agua dulce grandes con escasa circulación de agua o bien en aguas calmas que presenten sedimentos blandos (Hecker, 1993).

Las características distintivas de *C. carpio* son la presencia de dos barbillas carnosas a cada lado de los premaxilares y las espinas fuertes y aserradas de la porción anterior de las aletas dorsal y anal. Presenta un color pardo verdoso, con reflejos dorados y azulados. El cuerpo es robusto, pesado y poco comprimido, ligeramente curvado en el vientre. Los ejemplares pueden alcanzar un peso máximo de 37 Kg. y una longitud estándar máxima de 120 cm. Pueden vivir hasta 9 años (Ringuelet et. al., 1967).

Es una especie bentopelágica. Los adultos y juveniles son omnívoros, consumen una gran variedad de tejidos animales y vegetales, preferentemente quironómidos, cladóceros, oligoquetos, otros invertebrados, plancton, macroalgas, y plantas acuáticas (Hecken, 1993).

La reproducción tiene lugar durante la primavera y principios del verano. Es muy prolífica, su fecundidad relativa es de 100.000 a 300.000 huevos por Kg. de peso corporal. Los machos alcanzan la madurez sexual a los 3 o 4 años de edad, mientras que las hembras a los 4 o 5 años (Hecken, 1993).

*C. carpio* También efectúa migraciones, pero de corto alcance. En trabajos de marcaciones realizadas en el Río de la Plata interior, se obtuvieron recapturas en el delta del Paraná (Baigún et al., 2003).

Es considerada una especie plaga debido a que los individuos desentierran y destruyen la vegetación sumergida debido a sus hábitos de escarbar en el sedimento mientras se alimentan, provocando además un aumento en la turbidez y descenso de los tenores de oxígeno del agua (Fabiano et al., 1992). De esta forma ejercen un efecto deletéreo sobre la biota acuática y provocan serios problemas en algunos ecosistemas. De acuerdo con Fabiano et. al. (1992) la carpa en nuestro país no estaría desplazando a las especies nativas, sino colonizando ambientes previamente modificados por el hombre. Su alta fecundidad y su tolerancia a factores ambientales desfavorables explican la proliferación de esta especie en ambientes degradados por la acción antropogénica donde las especies nativas estaban destinadas a desaparecer (Welcomme, 1988).

### VII. 1. 3. *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1847)

*Leporinus obtusidens* (Fig.11), pertenece a la Clase Actinopterigios, Orden Characiformes Familia Anostomidae. Su nombre común es boga (Braga, 1993).

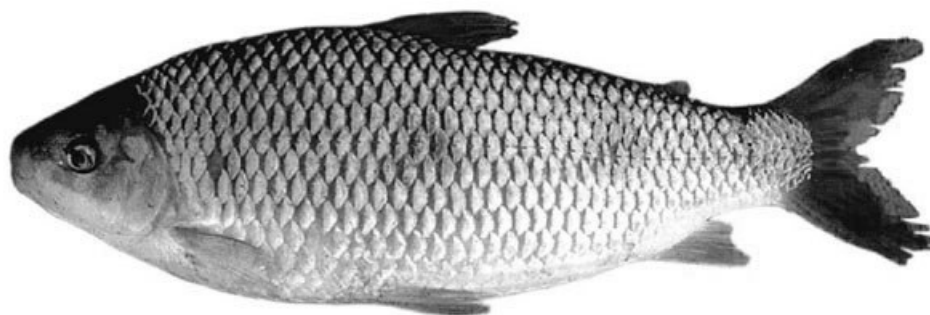


Fig. 11. *Leporinus obtusidens*

Su distribución abarca los ríos Paraguay, Pilcomayo, Bermejo, Paraná, Juramento, Uruguay medio e inferior, Río de la Plata, Salí-Dulce. También se la encuentra en Brasil, en Amazonia, ríos San Francisco, das Velhas, Moggi-Guassu. Sin

embargo en los últimos años se ha detectado una marcada desaparición (Ringuelet et al., 1967; Radünz Neto et al., 2006).

Esta especie presenta un cuerpo moderadamente alargado y grueso. Cabeza alargada, de hocico romo, boca pequeña con 6 dientes arriba y abajo. Color gris verdoso, con tres manchas oscuras redondeadas en la mitad del flanco. En los juveniles hay además ocho barras verticales gruesas, desde el dorso hasta la línea lateral. Los ejemplares adultos pueden alcanzar 80 cm de longitud total y 10 Kg de peso (Ringuelet et al., 1867; Braga et al., 1993).

La boga habita tanto ambientes lénticos como lóticos (Ringuelet et al., 1967; Bonetto et al., 1969, 1970). Su dieta es omnívora, se alimenta de granos, semillas, vegetales, invertebrados y peces pequeños (Hahn et al., 1998).

Tiene importancia para pesca deportiva, artesanal y comercial (Baigún et al., 2003). Se lo captura con aparejo, boguero y cercos con redes agalleras, haciendo cebaderos con maíz, pasta o trigo (FUEM- NUPELIA, 1987). Es una de las especies más comunes y abundantes recolectadas en varias estaciones experimentales de cría ubicadas en el río Paraná (Roa y Permingeat, 1999; Bechara et al., 1999).

*L. obtusidens* realiza migraciones aguas arriba con fines reproductivos una vez al año (Oldani y Oliveros, 1984; Oldani et al., 1992; Agostinho et al., 1995). Los trabajos de marcación y recaptura en el Río de la Plata interior y bajo río Uruguay permitieron afirmar que el circuito migratorio abarca los ríos Paraná y sus afluentes hasta el alto Paraná, Uruguay, Paraguay y Río de la Plata. Si bien se registraron migraciones en distintas direcciones, en la mayor parte de los casos se repite un esquema general: durante el verano se concentran cardúmenes de estas especies en el Río de la Plata interior y Uruguay inferior, y durante el otoño efectúan desplazamientos ascendentes por el río Paraná, lo que implica desplazamientos promedio de 450 a 500 Km (Baigún et al., 2003).

No se conoce mucho sobre su ciclo reproductivo, si bien se sabe que la edad de primera madurez es a los dos años y que el desove se concentra entre octubre y diciembre (Delfino y Baigún, 1985).

#### **VII. 1. 4. *Cichlasoma facetum* (Jenyns, 1842)**

*Cichlasoma facetum* (Fig. 12) también llamada *Australoheros facetus* pertenece al Orden Perciformes, Familia Cichlidae. Su distribución es subtropical. En nuestro país abarca los ríos Iguazú, Paraná, Uruguay, de la Plata, Salado. También se la encuentra en Uruguay y el sur de Brasil (Ringuelet et al., 1967; Musilová et al., 2008).

Es una especie bentopelágica de agua dulce. Se encuentra en una gran variedad de hábitats, aunque es más abundante en pequeños cuerpos de agua tales como estanques, pequeños lagos y arroyos (Bulus et al., 2004).

Son de color muy variable, generalmente de fondo pardo oliváceo, con seis fajas negras transversas, una de las más notorias particularidades es el cambio de coloración, observada en el periodo reproductivo. Cuerpo orbicular, de perfil dorsal muy curvo, algo más ovalado en individuos de corta edad. Alcanzan una longitud total máxima de 18 cm.

Es una especie de importancia en acuarios, ya que son de fácil mantenimiento y se reproducen bajo condiciones controladas (Bulus et al., 2004).



Fig. 12. *Cichlasoma facetum*

## VIII. Hipótesis más relevantes

- El plomo se encuentra presente en aguas y sedimentos del río de la Plata, predominantemente en aquellas zonas cercanas a descargas cloacales. En consecuencia las poblaciones de peces residentes en estas zonas, especialmente las bentónicas, habrán incorporado y acumulado el metal en sus tejidos.
- El grado de reactivación de la actividad del ALA-D sanguínea sería una herramienta válida para el biomonitoreo de ambientes contaminados por plomo.
- Existirían diferencias interespecíficas en referencia a la actividad basal del ALA-D y a su grado de inhibición.

## IX. Objetivos

### IX. 1. Objetivo general

Validar un método de evaluación general de riesgo ecotoxicológico por exposición a plomo en poblaciones naturales de peces.

### IX. 2. Objetivos particulares

- Estudiar la actividad basal de ALA-D en sábalos (*Prochilodus lineatus*), y chanchitas (*Cichlasoma facetum*).
- Evaluar la variabilidad natural de la actividad de ALA-D en *P. lineatus* y *C. facetum*.
- Estudiar el grado de inhibición de ALA-D sanguínea y hepática en relación al contenido de plomo del organismo.
- Evaluar el efecto de la exposición experimental a plomo sobre la actividad de ALA-D.
- Optimizar la técnica de reactivación de la actividad de ALA-D en sangre e hígado de peces.

- Comparar el grado de inhibición de la actividad de ALA-D en sábalos de tres localidades del Río de la Plata que pueden presentar diferente grado de contaminación.
- Comparar la actividad de ALA-D en especies de peces con diferentes estrategias alimenticias de tres localidades del Río de la Plata.
- Analizar indicadores fisiológicos del estado sanitario: hematocrito, contenido de hemoglobina, factor de condición e índice hepato-somático.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## I. Recolección de peces

### I. 1. *Prochilodus lineatus*

Los ejemplares fueron recolectados por pescadores artesanales en el río de la Plata, en las costas de Berazategui, Berisso y Atalaya, provincia de Buenos Aires. También se recolectaron ejemplares en el río Paraná, en la costa de Corrientes, provincia de Corrientes.

Los peces provenientes de Berazategui ( $n = 87$ ) fueron trasladados al laboratorio en recipientes plásticos de 50 L de capacidad, conteniendo agua de río. En esta zona se realizaron muestreos bimestrales entre los meses de junio de 2002 a mayo de 2004.

Los peces provenientes de Berisso ( $n = 31$ ), Atalaya ( $n = 21$ ) y Corrientes ( $n = 5$ ) fueron procesados *in situ*. En Berisso se realizaron muestreos en octubre de 2002, abril y noviembre de 2003; en Atalaya en noviembre de 2002, octubre de 2003 y abril de 2004 y en Corrientes en diciembre de 2003.

#### I. 1. 1. Características generales de los ejemplares de *P. lineatus*

En el laboratorio se determinó el peso corporal en gramos y la longitud total en centímetros de los peces. La longitud total es la medida que se obtiene desde el extremo de la cabeza hasta el extremo de la cola. El sexo se determinó por observación de las gónadas. Para este estudio se seleccionaron ejemplares adultos y sexualmente inmaduros

En las tablas 2; 3; 4 y 5 se presenta la longitud total y el peso corporal de los ejemplares seleccionados, provenientes de Berazategui, Berisso, Atalaya y Corrientes, respectivamente. Los datos se encuentran discriminados por sexo y por muestreo.

Tabla 2. Longitud total y peso corporal ( $x \pm DE$ ) de *P. lineatus* colectados en Berazategui.

<b>Muestreo</b>	<b>Sexo</b>	<b>n</b>	<b>Longitud total (cm)</b>	<b>Peso (g)</b>
<b>Jun-02</b>	H	5	47,6 ± 7,0	3396 ± 1679
	M	7	49,1 ± 1,0	3526 ± 111
<b>Jul-02</b>	H	4	46,8 ± 2,4	3089 ± 633
	M	3	47,0 ± 1,0	3545 ± 126
<b>Oct-02</b>	H	6	42,5 ± 7,8	2855 ± 1831
	M	3	45,0 ± 1,4	2718 ± 182
<b>Dic-02</b>	H	4	51,0 ± 2,2	3629 ± 596
	M	5	43,8 ± 3,6	2630 ± 773
<b>Feb-03</b>	H	5	42,5 ± 1,9	2257 ± 336
	M	3	41,4 ± 3,2	2339 ± 785
<b>Abr-03</b>	H	7	49,8 ± 3,1	3903 ± 852
	M	3	48,5 ± 1,8	3391 ± 1265
<b>Jun-03</b>	H	5	48,6 ± 3,8	3574 ± 743
	M	3	44,3 ± 4,0	2492 ± 630
<b>Sep-03</b>	H	4	47,6 ± 2,6	2989 ± 636
	M	3	45,1 ± 4,1	2923 ± 696
<b>Dic-03</b>	H	4	47,3 ± 6,8	3720 ± 1609
	M	3	42,8 ± 3,0	2617 ± 242
<b>Feb-04</b>	H	4	43,8 ± 6,0	2561 ± 1229
	M	3	42,8 ± 10,3	2469 ± 2010
<b>May-04</b>	H	4	49,4 ± 1,6	3490 ± 308
	M	4	43,6 ± 4,1	2628 ± 957

n = Número de individuos; H = hembras; M = machos

Tabla 3. Longitud total y peso corporal ( $x \pm DE$ ) de *P. lineatus* colectados en Berisso.

<b>Muestreo</b>	<b>Sexo</b>	<b>n</b>	<b>Longitud total (cm)</b>	<b>Peso (g)</b>
<b>Oct-02</b>	H	3	40,0 ± 1,0	1920 ± 46
	M	6	39,9 ± 5,2	1696 ± 433
<b>Abr-03</b>	H	7	40,9 ± 7,8	1921 ± 1053
	M	4	39,6 ± 8,0	1513 ± 769
<b>Nov-03</b>	H	8	40,6 ± 3,8	1925 ± 619
	M	3	37,3 ± 3,1	1467 ± 633

n = Número de individuos; H = hembras; M = machos

Tabla 4. Longitud total y peso corporal ( $x \pm DE$ ) de *P. lineatus* colectados en Atalaya.

<b>Muestreo</b>	<b>Sexo</b>	<b>n</b>	<b>Longitud total (cm)</b>	<b>Peso (g)</b>
<b>Nov-02</b>	H	3	43,8 ± 0,3	2250 ± 265
	M	3	43,3 ± 3,9	2050 ± 212
<b>Oct-03</b>	H	4	41,7 ± 4,7	1720 ± 627
	M	3	41,0 ± 7,1	1300 ± 283
<b>Abr-04</b>	H	3	41,6 ± 2,4	1732 ± 243
	M	5	42,7 ± 3,0	1940 ± 494

n = Número de individuos; H = hembras; M = machos

Tabla 5. Longitud total y peso corporal ( $x \pm DE$ ) de *P. lineatus* colectados en Corrientes.

<b>Muestreo</b>	<b>Sexo</b>	<b>n</b>	<b>Longitud total (cm)</b>	<b>Peso (g)</b>
<b>Dic-03</b>	H	3	40,2 ± 4,6	1463 ± 436
	M	2	38,5 ± 5,1	1282 ± 325

n = Número de individuos; H = hembras; M = machos

## **I. 2. *Leporinus obtusidens* y *Cyprinus carpio***

En la costa de Berazategui, se recolectaron seis ejemplares de *Leporinus obtusidens* (Boga) y cinco de *Cyprinus carpio* (Carpa) durante diciembre y septiembre de 2003, respectivamente. En Berisso se recolectaron cuatro ejemplares de *L. obtusidens* y tres de *C. carpio* en octubre y noviembre de 2003, respectivamente. En la costa de Atalaya se recolectaron cuatro ejemplares de *L. obtusidens* y nueve de *C. carpio* durante noviembre y octubre de 2003, respectivamente. Todos los peces fueron recolectados con red por pescadores artesanales y procesados *in situ*.

### **I .2. 1. Características generales de los ejemplares**

En el laboratorio se determinó el peso corporal en gramos y la longitud total en centímetros y el sexo de los peces. Para este estudio sólo se seleccionaron individuos macho.

En las tablas 6 y 7 se presentan la longitud total y el peso corporal de los ejemplares de *L. obtusidens* y *C. carpio*, respectivamente. Los datos se encuentran discriminados por zona.

Tabla 6. Longitud total y peso corporal ( $x \pm DE$ ) de *L. obtusidens* machos de Berazategui, Berisso y Atalaya.

<b>Zona</b>	<b>n</b>	<b>Longitud total (cm)</b>	<b>Peso (g)</b>
<b>Berazategui (Dic-2003)</b>	6	47,0 $\pm$ 2,8	3110 $\pm$ 863
<b>Berisso (Oct-2003)</b>	4	45,3 $\pm$ 2,9	2160 $\pm$ 569
<b>Atalaya (Nov-2003)</b>	4	42,0 $\pm$ 3,1	1400 $\pm$ 320

n = número de individuos.

Tabla 7. Longitud total y peso corporal ( $x \pm DE$ ) de *C. carpio* machos de Berazategui, Berisso y Atalaya.

<b>Zona</b>	<b>n</b>	<b>Longitud total (cm)</b>	<b>Peso (g)</b>
<b>Berazategui (Sep-2003)</b>	5	51,2 $\pm$ 9,4	3624 $\pm$ 1439
<b>Berisso (Nov-2003)</b>	3	55,5 $\pm$ 7,8	3375 $\pm$ 530
<b>Atalaya (Oct-2003)</b>	9	43,9 $\pm$ 3,7	2328 $\pm$ 679

n = número de individuos.

### **I. 3. *Cichlasoma facetum***

Los ejemplares (n=95) fueron recolectados con caña, de un estanque artificial en el Campus de la Universidad de la Plata, Florencio Varela. Los peces fueron trasladados al laboratorio en tanques con agua del estanque. Se realizaron cuatro muestreos anuales durante un período de tres años desde febrero de 2001 a septiembre de 2003.

#### **I. 3. 1. Características generales de los ejemplares de *C. facetum***

En el laboratorio se determinó el peso corporal en gramos y la longitud total en centímetros y el sexo de los peces.

Los ejemplares de *C. facetum* seleccionados para este estudio fueron individuos adultos. En la tabla 8 se presenta la longitud total y el peso corporal de los ejemplares. Los datos se encuentran discriminados por sexo y por muestreo.

Tabla 8. Longitud total y peso corporal ( $x \pm DE$ ) de *C. facetum*.

<b>Muestreo</b>	<b>Sexo</b>	<b>n</b>	<b>Longitud total (cm)</b>	<b>Peso (g)</b>
<b>Feb-01</b>	H	4	12,3 $\pm$ 1,9	57,4 $\pm$ 17,6
	M	3	11,3 $\pm$ 0,6	61,2 $\pm$ 15,3
<b>Abr-01</b>	H	4	10,1 $\pm$ 2,4	39,8 $\pm$ 29,1
	M	3	9,9 $\pm$ 3,4	45,7 $\pm$ 42,9
<b>Ago-01</b>	H	6	11,8 $\pm$ 1,3	62,6 $\pm$ 16,4
	M	3	15,5 $\pm$ 4,1	36,3 $\pm$ 18,4
<b>Nov-01</b>	H	4	9,9 $\pm$ 2,7	46,0 $\pm$ 30,1
	M	5	9,7 $\pm$ 2,9	48,8 $\pm$ 31,4
<b>Feb-02</b>	H	5	9,4 $\pm$ 2,2	41,9 $\pm$ 30,3
	M	3	10,4 $\pm$ 1,8	47,6 $\pm$ 24,1
<b>Abr-02</b>	H	7	10,9 $\pm$ 3,1	53,1 $\pm$ 21,1
	M	3	12,3 $\pm$ 1,2	68,0 $\pm$ 27,1
<b>Ago-02</b>	H	5	7,4 $\pm$ 2,9	14,3 $\pm$ 5,7
	M	3	8,6 $\pm$ 1,4	26,1 $\pm$ 14,0
<b>Dic-02</b>	H	4	7,4 $\pm$ 2,6	18,1 $\pm$ 19,4
	M	3	9,4 $\pm$ 1,5	31,7 $\pm$ 4,5
<b>Feb-03</b>	H	4	14,6 $\pm$ 3,2	50,4 $\pm$ 30,9
	M	3	9,6 $\pm$ 2,7	35,1 $\pm$ 17,3
<b>Abr-03</b>	H	4	9,6 $\pm$ 3,3	32,3 $\pm$ 22,1
	M	3	9,5 $\pm$ 1,8	32,1 $\pm$ 19,5
<b>Ago-03</b>	H	4	9,0 $\pm$ 3,6	24,3 $\pm$ 21,5
	M	4	10,1 $\pm$ 1,4	40,0 $\pm$ 16,8
<b>Nov-03</b>	H	4	8,5 $\pm$ 2,5	21,3 $\pm$ 11,4
	M	4	10,4 $\pm$ 1,9	39,9 $\pm$ 21,2

n = Número de individuos; H = hembras; M = machos

## II. Materiales, reactivos y condiciones de trabajo

Todo el material de laboratorio empleado fue de vidrio de borosilicato o de plástico de polipropileno, convenientemente prelavados.

El proceso de lavado se realizó en dos etapas. En la primera se empleó detergente neutro, abundante agua corriente de red y por último agua destilada. Posteriormente el material fue tratado con HNO<sub>3</sub> 10% v/v, y luego de un lapso mínimo de 24 horas, fue enjuagado con agua destilada.

Para la recolección de sangre se utilizaron jeringas descartables de 1 mL o de 5 mL.

El anticoagulante utilizado fue heparina sódica 50000 U U.S.P. (Northia).

Para realizar el microhematocrito se utilizaron tubos capilares (Wimpy) seleccionados con heparina de 75 mm de longitud y de diámetro externo de 140-160 mm.

En la determinación de la actividad de la enzima ALA-D se utilizó solución reguladora fosfato pH 6,2, solución reguladora sustrato 0,1M, ácido tricloroacético y reactivo de Ehrlich.

La solución reguladora sustrato (10 mM) fue preparada en el momento de usar, se diluyeron 16,76 mg de ácido delta aminolevulínico (ALA; Fluka) en 5 mL de solución acuosa 0,1 M de fosfato monosódico. Se llevó a pH 6,2 con la solución acuosa 0,1 M de fosfato disódico y se completó a 10 mL con solución reguladora fosfato pH 6,2.

El reactivo de Ehrlich fue preparado al momento de usar, se disolvieron 0,24 g de p-dimetilaminobenzaldehído (p-DMAB) en 7,2 mL de ácido acético glacial, posteriormente se le agregó 1,92 mL de ácido perclórico, completando a un volumen de 12 mL con ácido acético glacial.

Para la determinación del contenido de proteínas se utilizó el método de Lowry (1951), que emplea reactivo de Folin y albúmina cristalina de suero bovino como estándar.

### **III. Tratamiento y separación de muestras**

En la Fig. 13 se presenta un diagrama general del destino de las muestras extraídas de los ejemplares de peces.

El procedimiento para la extracción de sangre varió de acuerdo a las especies. En *C. facetum* la sangre se extrajo de venas branquiales, mientras que en el resto de las especies se extrajo de la vena caudal.

La sangre de peces usualmente coagula rápidamente. Una vez extraída, la sangre se dispuso inmediatamente en tubos tipo eppendorfs de 2 mL, que contenían una concentración de 0,30 mg de heparina por mL de sangre. Para cada muestra se conservaron dos alícuotas, una para la determinación del número de glóbulos rojos y la actividad de la enzima ALA-D y otra para la determinación del contenido de plomo.

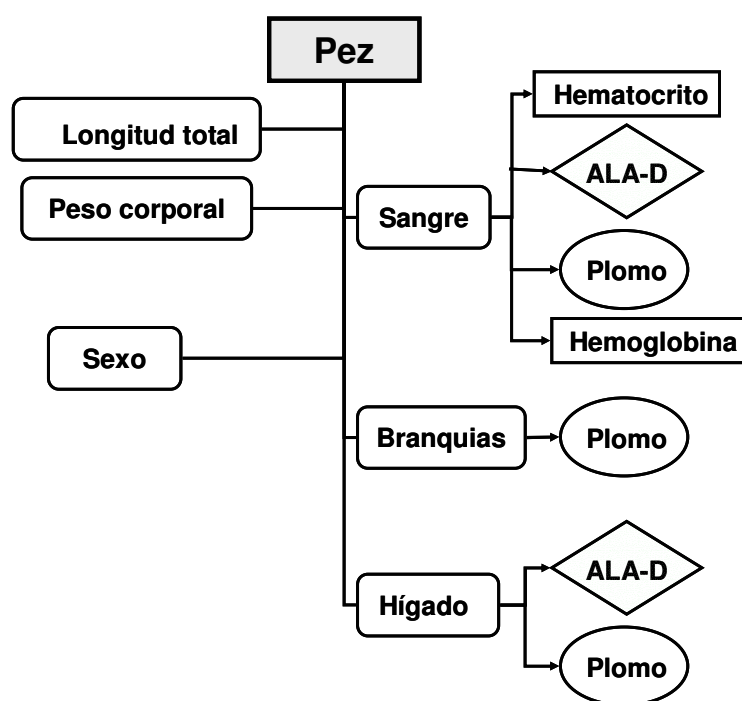


Fig. 13. Destino de las muestras

Para la determinación del número de glóbulos rojos (GR) se realizó un microhematocrito. La sangre fue introducida en el tubo capilar por acción capilar, uno de los extremos del tubo se selló por calor y posteriormente se centrifugó a 12000 g durante 5 minutos. Se midió la longitud de la columna compuesta por los glóbulos rojos (LGR) y la longitud total comprendida por glóbulos rojos y sobrenadante (LT). El

hematocrito (Hct) se calculó como el radio de estos valores y se expresó como porcentaje:

$$Hct = \frac{LGR}{LT} \times 100$$

Las muestras destinadas a la determinación del ALA-D fueron conservadas en N<sub>2</sub> líquido y las del contenido de plomo a -20 °C, hasta su análisis.

Para el análisis del contenido de hemoglobina, se volvió a extraer sangre de la forma indicada anteriormente pero se utilizó solución de EDTA (0,342 M) como anticoagulante. Estas muestras se conservaron a 4 °C.

Posteriormente, los peces fueron sacrificados. Se extirparon las branquias y se les realizó una incisión ventral desde la cloaca hasta la primera aleta pectoral. Se extirpó el hígado completo.

Las branquias fueron lavadas con agua desionizada, se secaron sobre papel de filtro y se conservaron a -20 °C hasta la determinación de plomo.

El hígado fue lavado con la solución reguladora de homogenización (Tris-HCl 50 mM pH 7,4), se secó sobre papel de filtro y se pesó. Se conservó, aproximadamente 1 g a -20 °C para la determinación de plomo. El resto del hígado se homogenizó con la solución reguladora de homogenización (1: 3 peso: volumen) usando un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem provisto con émbolo de teflón. La fracción postmitocondrial (FPM) se obtuvo a partir del homogenato (H), por centrifugación a 11700 g durante 20 minutos.

Se conservaron alícuotas de H y FPM en nitrógeno líquido y a -20 °C hasta la determinación de la actividad enzimática y del contenido de proteínas, respectivamente.

#### **IV. Técnica de determinación de la actividad de la enzima ALA-D**

Para la determinación de la actividad de la enzima ALA-D en sangre, se hemolizaron 0,1 mL de sangre con 0,65 mL de agua destilada (Berlin et. al, 1974). La sangre hemolizada se incubó a 38 °C durante 15 minutos y luego se adicionaron 0,5 mL

de solución reguladora sustrato. Paralelamente se procesó un tubo control con 0,5 mL de solución reguladora sustrato, 0,1 mL de sangre, 0,65 mL de agua destilada y 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final de 10%.

Las mezclas de reacción fueron incubadas durante una hora a 38 °C. La reacción fue detenida agregando 0,5 mL de TCA a una concentración final de 10 %. Las muestras fueron centrifugadas a 4000 r.p.m. durante 10 minutos; luego, se separó 1 mL de sobrenadante adicionándole 1 mL de reactivo de Ehrlich. Las muestras fueron incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se determinó el contenido de porfobilinógeno (PBG) por espectrofotometría a 555nm en un espectrofotómetro UV-visible Metrolab 325 digital.

Para el ensayo de la enzima en hígado, se adicionaron 0,5 mL de solución reguladora sustrato a 0,2 mL de homogenato o fracción postmitocondrial (1-10 mg de proteína). Paralelamente se procesó un blanco con 0,5 mL de solución reguladora sustrato, 0,2 mL de muestra y 0,5 mL de TCA a una concentración final de 10%. Luego las mezclas de reacción fueron incubadas durante una hora a 38 °C, procediéndose de igual forma que la descrita para las muestras de sangre.

Una unidad (U) de actividad enzimática se definió como 1 nmol de PBG formado en una hora a 38 °C. La actividad enzimática en sangre se expresó como U (mLGR)<sup>-1</sup>, mientras que la hepática se expresó como actividad específica: U (mg de proteína)<sup>-1</sup>.

U se calculó como:

$$U = \frac{(Am - Ab)}{\epsilon \times l} \times \frac{Vol.Mz.}{Vol.Mu.} \times dTCA \times dE \times \frac{1}{t}$$

Donde:

*Am*: absorbancia de la muestra a 555 nm

*Ab*: absorbancia del blanco a 555 nm

$\epsilon$ : coeficiente de extinción molar de Ehrlich = 0,062 L .  $\mu\text{mol}^{-1}$  .  $\text{cm}^{-1}$

*l*: espesor de la muestra en cm (1 cm), se tomó el ancho de la cubeta

*Vol. Mz*: volumen de la mezcla de reacción = 1,25 mL (sangre); 0,7 mL (H o FPM)

*Vol. Mu*: volumen de muestra = 0,1 mL (sangre); 0,2 mL (H o FPM)

*dTCA*: factor de dilución de TCA =  $\frac{Vol.total}{Vol.Mz}$

$$dE: \text{factor de dilución de Ehrlich} = \frac{Vol.lectura(2mL)}{Vol.sobrenadante(1mL)}$$

t: tiempo 1 hora

La actividad enzimática en sangre se calculó como:

$$\frac{U \times 100}{Hct}$$

Donde

Hct: Hematocrito en porcentaje

La actividad específica se calculó como:

$$\frac{U}{mg.prot. \times mL^{-1}}$$

Donde:

mg prot x mL<sup>-1</sup>: miligramo de proteína hepática por mL de H o FPM

#### **IV. 1. Optimización de la metodología para la determinación de la actividad de la enzima ALA-D en sangre**

##### **IV. 1. 1. Estudio de la actividad de la enzima ALA-D en función del pH de la solución reguladora del medio de incubación**

Se trabajó con muestras de sangre de *P. lineatus*, *L. obtusidens*, *C. carpio* y *C. facetum*; utilizándose cinco muestras de cada especie.

Las soluciones reguladoras sustrato (0,01M) fueron preparadas diluyendo 16,76 mg de ácido delta aminolevulínico (Fluka) en 5 mL de solución acuosa 0,1 M de fosfato monosódico. Se llevó al pH deseado con la solución acuosa 0,1 M de fosfato disódico y se completó a 10 mL con solución reguladora fosfato del pH correspondiente. Se prepararon soluciones reguladoras sustrato de pH: 5,4; 5,8; 6,2; 6,6 y 7,0.

La actividad enzimática se determinó incubando cada muestra, por duplicado, con las soluciones reguladoras sustrato de distinto pH.

#### **IV. 1. 2. Estudio de la actividad de la enzima ALA-D en relación a la temperatura de reacción**

Se trabajó con muestras de sangre de *P. lineatus* (n=6) y *C. facetum* (n=5).

En cada ensayo se determinó la actividad de la enzima ALA-D a diferentes temperaturas de incubación. Las temperaturas estudiadas fueron de 10, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 y 90°C.

Para cada muestra y cada temperatura de incubación se determinó la actividad de la enzima por duplicado.

#### **IV. 1. 3. Estudio de la actividad de la enzima ALA-D en función de la concentración de sustrato**

Se trabajó con muestras de sangre de *P. lineatus*, *L. obtusidens*, *C. carpio* y *C. facetum*. Se utilizaron cinco muestras de cada especie.

Se evaluó la actividad de la enzima ALA-D a diferentes concentraciones de sustrato (0,001 a 0,02 M). El pH de la solución reguladora sustrato fue de 6,2.

La actividad enzimática se determinó incubando cada muestra, por duplicado, con las soluciones reguladoras sustrato de distintas concentraciones.

#### **IV. 1. 4. Estudio de la conservación de las muestras**

Se trabajó con muestras de sangre de *P. lineatus* (n=6).

En cada ensayo se determinó la actividad de la enzima ALA-D el mismo día de la extracción de las muestras. Posteriormente, las muestras se conservaron en nitrógeno líquido y se volvió a medir la actividad enzimática a los 8, 15, 47, 101 y 365 días.

Para cada muestra se determinó la actividad enzimática por duplicado.

#### IV. 1. 5. Reactivación de la actividad de la enzima ALA-D mediante el empleo de DTT, Zn<sup>2+</sup> o una combinación de ambos

Para la optimización de la reactivación de la actividad de la enzima sanguínea se trabajó con el agregado *in vitro* de DTT, Zn<sup>2+</sup> o una combinación de ambos. Se emplearon soluciones madre de DTT de 20 mM y de acetato de Zn de 500 μM. Para el empleo de DTT o la mezcla se utilizaron muestras de *P. lineatus* (n= 6); mientras que para Zn<sup>2+</sup> se trabajó con muestras de *P. lineatus*, *L. obtusidens*, *C. carpio* y *C. facetum*, utilizándose 6 muestras de cada especie.

Las muestras de sangre (0,1 mL) fueron hemolizadas con diferentes volúmenes de agua desionizada y solución madre de DTT o acetato de Zn<sup>2+</sup> o ambas hasta un volumen final de 0,75 mL. Las muestras se incubaron con el agente reactivante durante 15 minutos a 38° C, luego se procedió de igual forma que lo descrito anteriormente (IV).

Se evaluó el porcentaje de reactivación del ALA-D utilizando distintas concentraciones finales de DTT (0,024; 0,048; 0,24; 2,4; 2,8; 4,8 y 10 mM), acetato de Zinc (0,24; 5; 10; 15; 20; 30; 40; 50; 60; 80 y 100 μM) o la combinación de 0,24 mM de DTT y acetato de Zinc (0,24; 1; 5; 10; 20; 40; 60; 80 y 100 μM).

El porcentaje de inhibición (% I) de ALA-D se calculó de la siguiente forma:

$$\%I = \left( 1 - \frac{ALA-D}{ALA-D_R} \right) \times 100$$

Donde:

*ALA-D*: actividad no reactivada de la enzima ALA-D. Actividad determinada en ausencia de DTT, Zn<sup>2+</sup> o ambos, en la mezcla de incubación.

*ALA-D<sub>R</sub>*: actividad reactivada de la enzima ALA-D. Actividad determinada en presencia de DTT, Zn<sup>2+</sup> o ambos, en la mezcla de incubación.

El efecto de la concentración final del DTT y Zn<sup>2+</sup> sobre la actividad de la enzima ALA-D se evaluó considerando las actividades relativas respecto del máximo valor observado.

## **IV. 2. Optimización de la metodología para la determinación de la actividad de la enzima ALA-D en tejido hepático**

### **IV. 2. 1. Estudio de la actividad de la enzima ALA-D en homogenato y fracción postmitocondrial**

Para este estudio se utilizaron 5 muestras de hígado de *P. lineatus*.

En cada ensayo se preparó un homogenato del hígado extraído y luego se separó la mitad del volumen del homogenato para preparar la fracción postmitocondrial.

Se midió la actividad de la enzima ALA-D en ambas fracciones. Para cada muestra se determinó la actividad de la enzima por triplicado.

### **IV. 2. 2. Estudio de la actividad de la enzima ALA-D en función del pH de la solución reguladora del medio de incubación**

Se trabajó con muestras de *P. lineatus* (n= 5) y de *C. facetum* (n=6).

Las soluciones reguladoras sustrato fueron preparadas como se describió anteriormente para las muestras de sangre (IV.1.1). Se prepararon soluciones reguladoras sustrato de pH: 5,4; 5,8; 6,2; 6,6 y 7,0.

La actividad enzimática se determinó en la FPM, incubando cada muestra, por duplicado, con las soluciones reguladoras sustrato de distinto pH.

### **IV. 2. 3 Estudio de la actividad de la enzima ALA-D en relación a la temperatura de reacción**

Se trabajó con muestras de hígado de *P. lineatus* y *C. facetum*, utilizándose para cada especie un total de 6 muestras.

En cada ensayo se determinó la actividad de la enzima ALA-D a diferentes temperaturas de incubación. Las temperaturas estudiadas fueron de 10, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 y 90°C.

Para cada muestra y cada temperatura de incubación se determinó la actividad de la enzima por duplicado.

#### **IV. 2. 4. Estudio de la actividad de la enzima ALA-D en función de la concentración de sustrato**

Se trabajó con muestras de hígado de *P. lineatus* (n=5) y de *C. facetum* (n=6).

Se evaluó la actividad de la enzima ALA-D a diferentes concentraciones de sustrato (0,001 a 0,02 M). Se trabajó con la fracción postmitocondrial y el pH de la solución reguladora sustrato utilizado fue de 6,2.

La actividad enzimática se determinó incubando cada muestra, por duplicado, con las soluciones reguladoras sustrato de distintas concentraciones.

#### **IV. 2. 5. Reactivación de la actividad de la enzima ALA-D en muestras de tejido hepático mediante el empleo de Zn<sup>2+</sup>**

Para la optimización de la reactivación de la actividad de la enzima en tejido hepático se trabajó con muestras de *P. lineatus* (n=7) y el agregado *in vitro* de DTT o Zn<sup>2+</sup>. Se emplearon soluciones madre de DTT de 20 mM y de acetato de Zn de 500 µM.

A la fracción postmitocondrial hepática (0,2 mL) se le adicionó 0,05 mL de agua deionizada y solución patrón hasta concentraciones finales de DTT (0,024; 0,24 y 2,4 mM), acetato de Zinc (5; 10; 15; 20; 25; 30; 50; 80; 100 y 120 µM). Todas las muestras se incubaron con el agente reactivante durante 15 minutos a 38° C, luego se procedió de igual forma que con el método descrito anteriormente (IV).

El porcentaje de inhibición (% I) del ALA-D se calculó de la siguiente forma:

$$\%I = \left( 1 - \frac{ALA - D_{NR}}{ALA - D_R} \right) \times 100$$

El efecto de la concentración final del DTT y  $Zn^{2+}$  sobre la actividad de la enzima ALA-D se evaluó considerando las actividades relativas respecto del máximo valor observado.

#### **V. Determinación del contenido de proteínas**

La determinación del contenido de proteínas se realizó por el método de Lowry et al. (1951).

Las muestras de homogenato y de fracción postmitocondrial se diluyeron en una proporción 1: 10 con NaOH 0,5 M. El volumen de muestra utilizado para la determinación del contenido de proteínas fue de 30  $\mu$ l.

#### **VI. Determinación del contenido de hemoglobina**

El contenido de hemoglobina fue determinado como cianometahemoglobina con el método colorimétrico Hemoglowiener de Wiener lab.

#### **VII. Determinación del contenido de plomo**

Las muestras de organismos enteros, hígados y branquias, fueron secadas suavemente sobre papel de filtro, pesadas y colocadas en tubos de 25 o mL de capacidad. A continuación se efectuó un proceso de digestión empleando ácido nítrico ultrapuro concentrado, y eventualmente ácido perclórico y calentando a una temperatura de 100-120°C hasta la destrucción total de la materia orgánica.

Una vez finalizado el proceso de digestión, las muestras fueron diluidas con solución 1%, v/v de ácido nítrico. Con el objeto de separar los residuos remanentes las muestras fueron filtradas, transfiriéndose el filtrado a un tubo graduado, llevando el volumen final a 5,00 mL con ácido nítrico 1 %.

Las muestras de agua (50 mL) acidificadas a  $pH < 2$  con ácido nítrico y luego concentradas por evaporación hasta 5 mL.

La cuantificación de Pb en muestras de tejido hepático, branquias y organismos enteros se efectuó con un espectrofotómetro de absorción atómica, Varian AA 575, mediante la directa aspiración del sobrenadante en una llama de aire-acetileno. En todos los casos se utilizó una lámpara de deuterio para corregir el ruido de fondo. La cuantificación de Pb se efectuó a la longitud de onda 217,0 nm. Cada muestra se analizó como mínimo por duplicado. Los valores de Pb en tejidos de organismos controles fueron menores de  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

La cuantificación se realizó mediante curvas de calibración con soluciones patrones, obtenidas a partir de diluciones apropiadas de soluciones patrones de Pb.

Las muestras de sangre fueron tratadas con 0,05 % de Tritón X-100 y 0,5 % de solución de fosfato. La cuantificación de Pb se realizó por AA-atomización electrotérmica

En todos los casos, se efectuó como mínimo un blanco de reactivos, cada 5 o 6 muestras, digerido paralelamente con éstas. En ningún caso se obtuvieron valores detectables de los distintos elementos en estudio.

## **IX. Experiencias de laboratorio**

Para ambas experiencias de laboratorio se utilizó agua de pozo previamente caracterizada. Los parámetros físico- químicos determinados fueron temperatura, pH, alcalinidad y dureza. La temperatura se determinó con un termómetro de mercurio, el pH con un pHmetro (Hanna HI 9321) y la alcalinidad y dureza por los métodos estandarizados (APHA-AWWA-WPCF, 1980). En la tabla 9 se presentan los valores registrados.

### **IX. 1. *Prochilodus lineatus***

En la tabla 10 se presenta la longitud total y el peso corporal de los ejemplares utilizados en este estudio. Los datos se encuentran discriminados por sexo y por tratamiento.

Tabla 9. Parámetros físico-química del agua utilizada en experiencias de exposición a plomo en condiciones de laboratorio

<b>Temperatura (°C)</b>	23-25
<b>pH</b>	8,4
<b>Alcalinidad (CaCO<sub>3</sub> mg L<sup>-1</sup>)</b>	406
<b>Dureza (CaCO<sub>3</sub> mg L<sup>-1</sup>)</b>	53

Tabla 10. Longitud total y peso corporal ( $X \pm DE$ ) de *P. lineatus* utilizados en la experiencia de laboratorio

<b>Tratamiento</b>	<b>n</b>	<b>Longitud total (cm)</b>	<b>Peso (g)</b>
<b>Control 0 días</b>	12	35,0 ± 1,4	1104 ± 113
<b>Control 7 días</b>	7	37,3 ± 1,5	1113 ± 91
<b>Expuesto 7 días</b>	9	33,7 ± 1,2	932 ± 118
<b>Control 15 días</b>	9	34,5 ± 2,1	1185 ± 171
<b>Expuesto 15 días</b>	8	35,1 ± 2,8	1148 ± 170

n = Número de individuos

El agua de exposición a plomo se preparó con una solución de 500 mg L<sup>-1</sup> de acetato de plomo diluida con el agua de pozo hasta una concentración final de exposición de 100 µg Pb L<sup>-1</sup>. Se trabajó con dos grupos de individuos (control y expuesto), los cuales fueron mantenidos durante 15 días en tanques distintos de acero inoxidable de 1000 L de capacidad, con circulación de agua por aireación y reemplazo de la mitad del volumen cada 48 h. El día de inicio de la experiencia se seleccionaron individuos control y se los procesó de la manera previamente descrita (III). A los 7 días de iniciada la experiencia se seleccionaron 2 individuos control y 3 expuestos a los que se les extrajo muestras de sangre e hígado. Se tomaron muestras de agua de cada tanque para determinar la concentración de plomo. A fin de mantener la proporción pez/agua constante se redujo el volumen de exposición a la mitad (500L). El muestreo a los 15 días se realizó de igual forma que a los 7. Durante el transcurso de los bioensayos los peces pudieron ser alimentados, debido a la imposibilidad de reproducir las condiciones de alimentación y características del alimento de esta especie.

## IX. 2. *Cichlasoma facetum*

En la tabla 11 se presenta la longitud total y el peso corporal de los ejemplares utilizados en este estudio. Los datos se encuentran discriminados por sexo y por tratamiento.

Tabla 11. Longitud total y peso corporal ( $X \pm DE$ ) de *C. facetum* utilizados en la experiencia de laboratorio

<b>Tratamiento</b>	<b>n</b>	<b>Longitud total (cm)</b>	<b>Peso (g)</b>
<b>Control 17 días</b>	12	8,6 $\pm$ 0,5	25 $\pm$ 9
<b>Expuesto 17 días</b>	12	7,8 $\pm$ 1,2	25 $\pm$ 5

n = Número de individuos

El agua de exposición a plomo se preparó con una solución de 42  $\mu\text{g L}^{-1}$  de acetato de plomo, que fue diluida con el agua de pozo hasta una concentración final de exposición de 100  $\mu\text{g Pb L}^{-1}$ . La experiencia fue llevada a cabo en 4 tanques plásticos cilíndricos de 49 L de capacidad, con circulación del agua por aireación y reemplazo de la misma cada 48 h. El número de peces por tanque fue de 6. La experiencia finalizó a los 15 días, se extrajeron muestras de sangre e hígado de todos los peces, se determinó el hematocrito, el contenido de hemoglobina y la actividad del ALA-D, conservándose organismos enteros (sin el hígado) y muestras de agua de cada tanque para la determinación del contenido de plomo. Durante el transcurso del estudio los peces fueron alimentados diariamente *ad libitum* con alimento estándar para peces.

## X. Determinación de los índices morfométricos

El factor de condición (FC) fue calculado de acuerdo a Bagenal y Tesch (1978):

$$FC = \frac{P}{L^3} \times 100$$

Donde:

P: Peso corporal del pez en gramos

L: Longitud total en centímetros

El índice Hepato-somático fue calculado de acuerdo a Sloff et. al. (1983)

$$IHS = \frac{Ph}{P} \times 100$$

Donde:

Ph: Peso del hígado del pez en gramos

## **XI. Análisis estadísticos**

Para todos los análisis estadísticos se utilizó el software Statistica versión 7.0.

Se empleó el método de análisis de varianza (ANOVA) para comparar los niveles de actividad enzimática en función del pH del medio de incubación, de la temperatura de reacción, del tiempo de conservación de las muestras en nitrógeno líquido. En hígado, además para comparar el uso de homogenato total o fracción postmitocondrial en la determinación de la actividad de ALA-D.

También se empleó ANOVA para comparar los niveles de actividad enzimática, parámetros hematológicos e índices morfométricos en relación al sexo, la época de muestreo y la zona de muestreo. Las diferencias entre la actividad de ALA-D sanguínea reactivada y no reactivada también se evaluaron con ANOVA.

Las diferencias entre peces controles y expuestos en la actividad de ALA-D, su grado de inhibición, parámetros hematológicos e índices morfométricos correspondientes a las experiencias de exposición a plomo en condiciones de laboratorio también fueron analizadas por ANOVA. El mismo análisis se realizó para evaluar la actividad de la enzima en relación a la concentración de DTT,  $Zn^{2+}$  o la mezcla de ambos.

Para comparar los niveles de concentración de plomo en los diversos tejidos a través de las distintas zonas o temporadas de muestreo o entre sexos o en las experiencias de exposición a plomo, se tuvo que emplear una prueba no paramétrica,

ya que las distribuciones de los datos no eran normales ni se verificaba homodasticidad. Por consiguiente, se eligió la prueba de Kruskal-Wallis (Sokal y Rohlf, 1997). La hipótesis nula de la pruebas no paramétricas está relacionada a la distribución de las variables. En estos casos se trata de averiguar si las distribuciones pueden pertenecer o no a una misma población. El mismo tipo de análisis se utilizó para estudiar las diferencias en la actividad del ALA-D, el IHS y los parámetros hematológicos de *P. lineatus* entre las distintas zonas de muestreo.

Las relaciones entre las distintas variables se estudiaron mediante el coeficiente de correlación (r) de Pearson.

En todos los casos se trabajó a un nivel de significación de las pruebas  $p < 0,05$ .

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## I. Caracterización de la enzima ALA-D en tejido sanguíneo y hepático de *Prochilodus lineatus*

El uso de parámetros bioquímicos como biomarcadores de contaminación requiere, en primera instancia, de la caracterización de algunos aspectos bioquímicos y fisiológicos básicos, así como de la optimización de la metodología para su análisis. En el caso particular de parámetros enzimáticos, se deben establecer todas aquellas variables que condicionan su actividad, tales como concentración óptima de sustrato, pH y temperatura del medio de reacción, tiempo de incubación, requerimiento de cofactores, fracción subcelular, entre las más importantes.

La determinación de la actividad de la enzima ALA-D se basa en la reacción entre el producto formado, porfobilinógeno (PBG) y el reactivo de Ehrlich. El reactivo forma una sal coloreada con el PBG y el color desarrollado se mide colorimétricamente. La cantidad de PBG formado es una medida de la actividad de la enzima.

Se han desarrollado varios métodos para la determinación de la actividad de la enzima ALA-D en sangre e hígado de mamíferos (Bonsignore et al, 1965; Burch y Siegel, 1971; Weissberg et al, 1971; Granick et al, 1973; Berlin y Schaller, 1974; Finelli et al, 1974; Yagminas y Villeneuve, 1987; Rocha et al, 1995; Santos et al, 1999; Goulart et al, 2001; Farina et al, 2003; Nogueira et al, 2003; Perottoni et al, 2004), aves (Murase et al, 1993; Tanhuanpää et al, 1999), peces (Hodson, 1976; Schmith et al, 1993; Conner y Fowler, 1994; Nakagawa H. et al, 1995c, 1997b; Martin et al, 1996; Campana et al, 2003) y anfibios (Peri et al, 1998a). Los distintos métodos difieren entre sí, principalmente, en la incorporación o no de Tritón X-100 para hemolizar la sangre; en la solución reguladora de homogenización para hígado; en el uso del homogenato entero o diferentes fracciones subcelulares de hígado, en la preparación del buffer sustrato, el tiempo y temperatura de incubación de la reacción; en la solución de TCA y en la preparación del reactivo de Ehrlich.

Para este trabajo se utilizó el método estandarizado por la Comunidad Europea de Berlin y Schaller (1974) en cuanto a la concentración de buffer sustrato (0,01 M de ALA en buffer fosfato de sodio pH 6,4) y al tiempo y temperatura de incubación de la reacción (1 hora y 38 °C).

En cuanto a la solución de TCA, Nakagawa H. et al. (1995 c) recomiendan una concentración final de 7 a 14 %; la cual es lo suficientemente alta como para asegurar una completa desproteínización y por consiguiente la pérdida de la mayor parte de los grupos –SH, que interfieren en la reacción del PBG con el reactivo de Ehrlich. Por esto, para este trabajo se usó una concentración final de TCA 10%.

El reactivo de Ehrlich se preparó según Burch y Siegel (1971). Este reactivo modificado contiene una concentración de ácido perclórico de 2 M. Otros autores (Bonsignori et al, 1965) recomiendan un reactivo de Ehrlich que contenga 4 M de ácido perclórico. De esta forma, la reacción desarrolla rápidamente color, pero debe ser leída 5 minutos después de iniciada porque se decolora muy rápidamente. Algunos autores recomiendan leer 15 minutos después de iniciada la reacción cuando se usa el reactivo de Ehrlich que contiene 2 M de ácido perclórico (Granick et al., 1972). El color permanece estable por un tiempo adicional de 10-15 minutos. Así, cuando se debe trabajar con numerosas muestras, la utilización de este reactivo brinda mayor tiempo para efectuar las determinaciones de absorbancia, antes de que el color desaparezca.

En este capítulo se describen los ensayos orientados a caracterizar diversos parámetros de la enzima ALA-D en muestras de sangre y de tejido hepático de *P. lineatus*. Específicamente se investigaron los niveles de actividad en función de las siguientes variables: el pH del medio de incubación; la temperatura; la concentración de sustrato; el tiempo de incubación de la mezcla de reacción y el tiempo de conservación de las muestras en N<sub>2</sub> líquido. En las muestras de tejido hepático, se investigó también la conveniencia de emplear el homogenato total o fracción postmitocondrial.

## **I. 1. Sangre**

### **I. 1. 1. Actividad de la enzima ALA-D en función del pH del medio de incubación**

El efecto del pH del medio de incubación sobre la actividad de la enzima se evaluó considerando las actividades porcentuales respecto del máximo valor observado. Los resultados se presentan en la Fig.14.

En esta especie, las máximas actividades enzimáticas se registraron en el rango de pH 5,4 - 6,2. En virtud de ello se trabajó con un pH de 6,2.

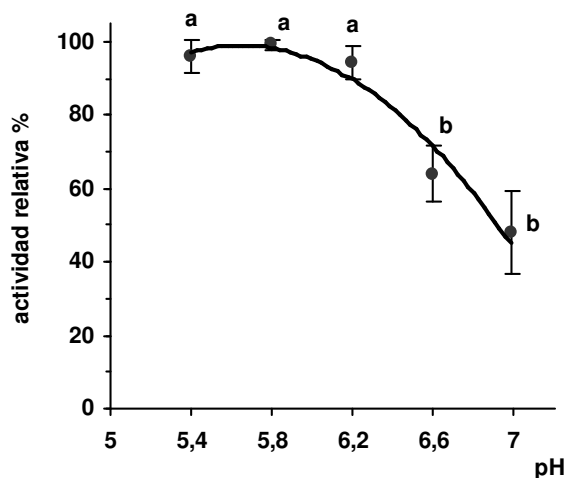


Fig. 14. Actividad de la enzima ALA-D en sangre de *P. lineatus* en función del pH del medio de incubación. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### I. 1. 2. Actividad de la enzima ALA-D en función de la temperatura de reacción

En la Fig. 15 se presenta la actividad de la enzima ALA-D en función de la temperatura de reacción.

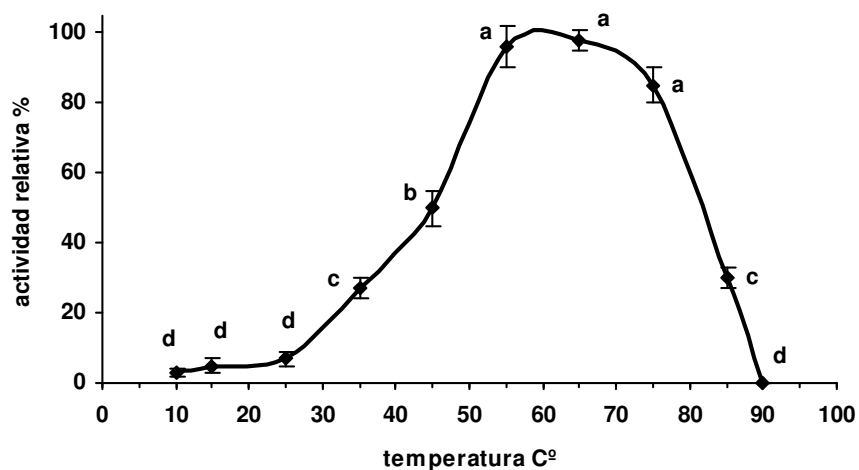


Fig. 15. Actividad de la enzima ALA-D en sangre de *P. lineatus* en función de la temperatura de reacción. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

La actividad de la enzima varió en función de la temperatura de reacción, presentando un máximo de actividad en un rango de temperaturas de 55 – 75 °C. Sin embargo en las determinaciones posteriores las muestras fueron incubadas a 38° C, de acuerdo a la metodología estandarizada y utilizada por otros autores (Hodson et al., 1977; Christensen et al. 1977; Larsson et al., 1985; Dwyer et al., 1988; Schmitt et al., 1984, 1993; Nakagawa H. et al., 1995a, 1995b, 1997a) en diferentes especies de peces a fin de realizar comparaciones.

### I. 1. 3. Actividad de la enzima ALA-D en función de la concentración de sustrato

En la Fig. 16 se presenta la relación entre la actividad de la enzima y la concentración del sustrato (ALA). Los datos se expresan como porcentaje. El Km aparente de la enzima para el ALA se estimó a partir de un análisis de Lineweaver-Burk, el cual resultó igual a 0,48 mM.

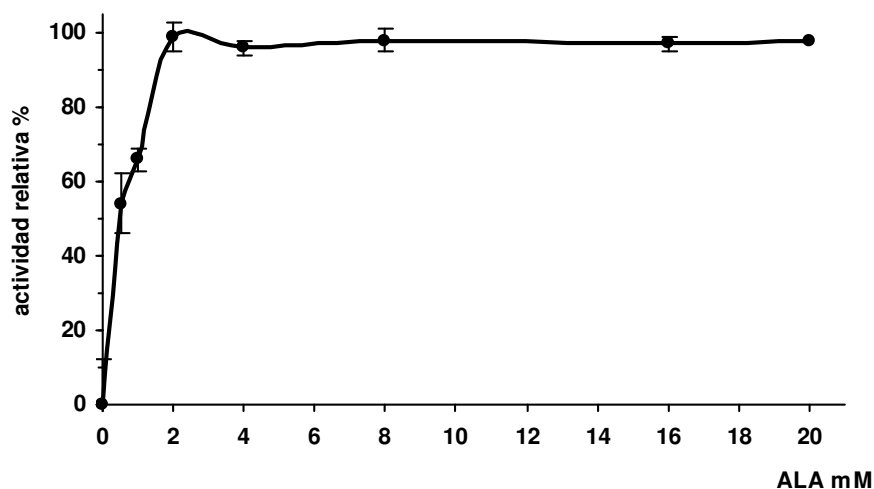


Fig. 16. Actividad de la enzima ALA-D en sangre de *P. lineatus* en función de la concentración de ALA

A partir de estos resultados se eligió una concentración de sustrato de 10 mM, a fin de asegurar que todas las determinaciones se realizaran en condiciones saturantes. Este valor concuerda con el reportado en el método estandarizado por la

Comunidad Europea (Berlin y Schaller, 1974). Esta concentración fue usada en todas las determinaciones restantes.

#### I. 1. 4. Estudio de la conservación de las muestras de sangre en nitrógeno líquido

En la Fig. 17 se muestran los resultados del estudio de la conservación de muestras de sangre en nitrógeno líquido. Se realizaron determinaciones de la actividad de la enzima ALA-D en sangre de *P. lineatus* el día de la recolección de la muestra ( $t = 0$ ), y luego a los 8; 15; 47; 101 y 365 días.

La actividad de la enzima ALA-D no presentó diferencias significativas entre los distintos tiempos de conservación de las muestras ( $p > 0,05$ ). Por consiguiente, las determinaciones de actividad pueden efectuarse transcurridos hasta 365 días de obtención de la sangre siempre y cuando la misma se mantenga conservada en nitrógeno líquido.

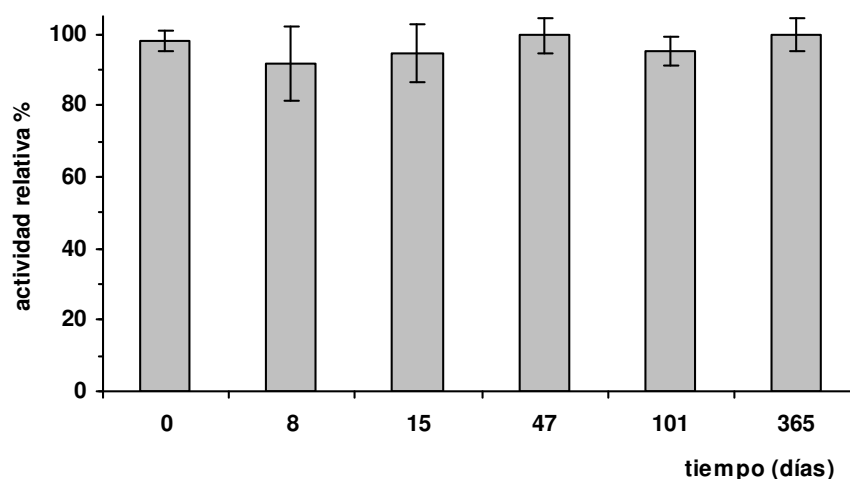


Fig. 17. Actividad relativa de la enzima ALA-D (%) en sangre de *P. lineatus* en función del tiempo (días) de conservación de las muestras en  $N_2$  líquido.

### I.2. Tejido hepático

#### I. 2. 1 Actividad de la enzima ALA-D en homogenato y fracción postmitocondrial

Se analizó la actividad específica enzimática en el homogenato entero y en la fracción postmitocondrial. En la Fig. 18 se muestran los resultados obtenidos.

La actividad específica de la enzima ALA-D en la fracción postmitocondrial resultó significativamente más elevada que la registrada en homogenato ( $p < 0,05$ ). Considerando que se trata de una enzima citosólica, este resultado pone en evidencia la purificación parcial de ésta una vez que se separan las mitocondrias.

De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió trabajar con la fracción postmitocondrial en el resto de los ensayos.

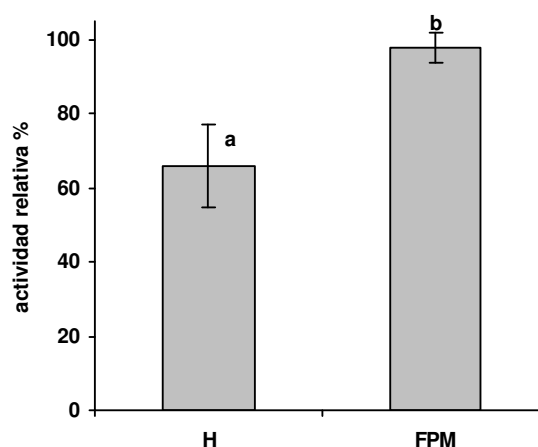


Fig. 18. Actividad específica relativa (%) de la enzima ALA-D en homogenato (H) y fracción postmitocondrial (FPM). Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### **I. 2. 2. Actividad de la enzima ALA-D en función del pH del medio de incubación**

En la Fig. 19 se muestra el efecto del pH del medio de incubación sobre la actividad enzimática. Se observó que la enzima presentó máxima actividad en el rango de  $\text{pH} = 5,8 - 6,6$ , el cual resultó similar al registrado en sangre.

### **I. 2. 3. Actividad de la enzima ALA-D en función de la temperatura de reacción**

En la Fig. 20 se presenta la actividad de la enzima ALA-D en función de la temperatura de reacción. La actividad de la enzima varió en función de la

temperatura de reacción, presentando un máximo de actividad en un rango de temperaturas de 55 – 75 °C. Estos resultados concuerdan con lo observado en las muestras de sangre.

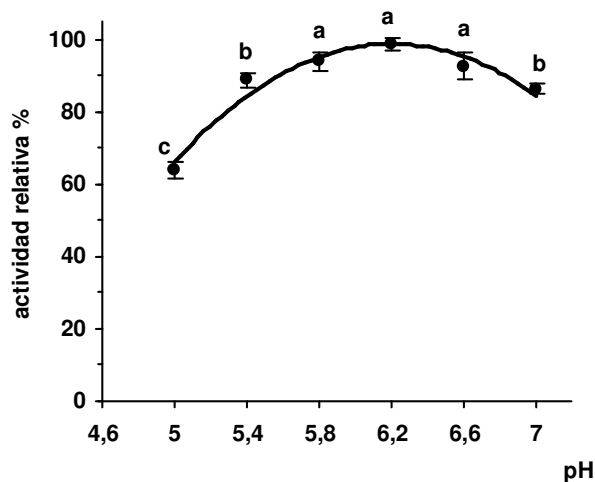


Fig. 19. Actividad de la enzima ALA-D en hígado de *P. lineatus* en función del pH de la solución reguladora del medio de incubación. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

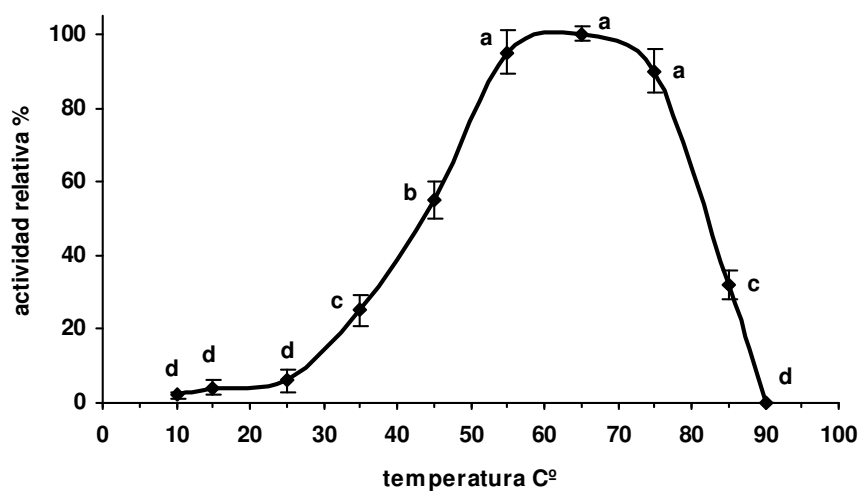


Fig. 20. Actividad de la enzima ALA-D en hígado de *P. lineatus* en función de la temperatura de reacción. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### I. 2. 4. Actividad de la enzima ALA-D en función de la concentración de sustrato

En la Fig. 21 se presenta la relación entre la actividad de la enzima en función de la concentración del sustrato. El  $K_m$  aparente de la enzima para el ALA se estimó a partir de un análisis de Lineweaver-Burk y resultó igual a 0,06 mM.

Si bien el  $K_m$  aparente en este tejido resultó mucho menor que el de sangre, también se eligió una concentración de sustrato en exceso de 10 mM con la cual medir la actividad de la enzima ALA-D en la fracción postmitocondrial.

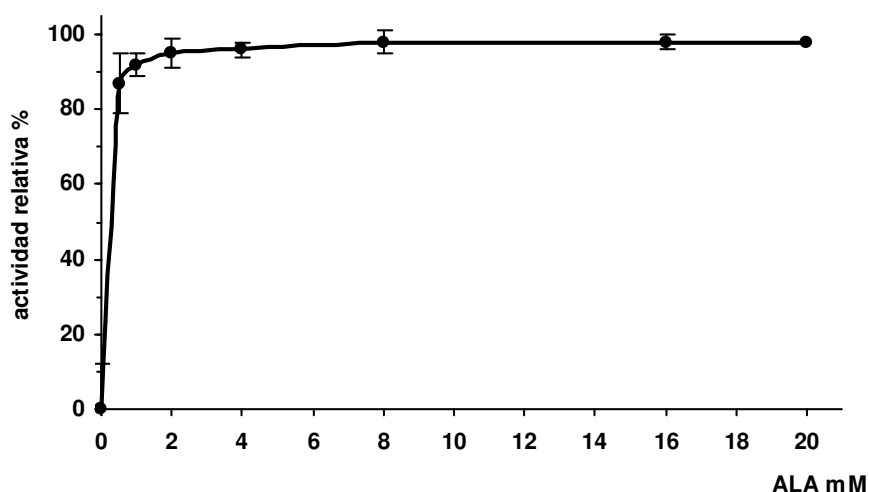


Fig. 21. Actividad de la enzima ALA-D en hígado de *P. lineatus* en función de la concentración de ALA.

### I. 3. Discusión

En la literatura se pueden encontrar algunos trabajos acerca de diversas características de la enzima ALA-D en distintos tejidos de organismos acuáticos (Brock y Brock, 1993; Aisenberg et al., 2005; Kutlu y Sümer, 2007), incluyendo peces (Conner y Fowler, 1994; Nakagawa K. et al., 1995; Alves Costa et al., 2007). Sin embargo, aún la información disponible no es demasiado abundante si consideramos que esta enzima ha sido considerada prácticamente como el parámetro “biomarcador ideal” de exposición a plomo (Peakall, 1994). La comparación con datos previos no siempre es posible debido a diferencias en las

condiciones de los ensayos (fracción subcelular, temperatura de incubación, unidades enzimáticas, etc.). Además tengamos presente que para nuestro estudio se trabajó con peces recolectados de ambientes naturales y de zonas que exhiben en general un considerable nivel de contaminación tanto por compuestos orgánicos (Janiot et al., 1997; Colombo et al., 2000; Aizpún et al., 2003; Colombo et al., 2007 a, b) como metálicos (Verrengia Guerrero y Kesten, 1993, 1994; Villar et al., 2001; Aizpún et al., 2003). No obstante, frente a ciertas características se pueden intentar algunas comparaciones.

Los valores de pH óptimos observados tanto en sangre como en hígado de *P. lineatus* se encuentran en el rango de 6,0 - 6,4 recomendado por Granick et al. (1973) para determinaciones de actividad en sangre de humanos. En relación a otras especies de peces; los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con el rango de pH óptimo reportado para la actividad de la enzima en sangre de *Salmo gairdneri* (Hodson et al., 1977) y en hígado de *Ictalurus punctatus* (Conner y Fowler, 1994). El rango de pH óptimo reportado para la enzima ALA-D de distintos invertebrados acuáticos fue, en cambio, ligeramente mayor, de 6,8 – 7,0 en los gastrópodos *Biomphalaria glabrata* y en los oligoquetos *Lumbriculus variegatus* (Aisemberg et al., 2005) y de 8,0 en los gastrópodos *Gammarus pulex* (Kutlu y Sümer, 2007).

Con respecto a la conservación de la muestras; los resultados obtenidos a cortos, medianos y largos períodos indican que la actividad enzimática permanece estable cuando la sangre es conservada en nitrógeno líquido. Dichos resultados concuerdan con estudios realizados en sangre de humanos por Granick et al. (1973). Estos autores observaron pérdida de actividad enzimática en sangre conservada a 4°C y a -20°C y una actividad estable en muestras almacenadas en nitrógeno líquido.

Los estudios cinéticos mostraron una notable diferencia entre la enzima ALA-D sanguínea y hepática. El Km aparente registrado para la enzima en sangre resultó aproximadamente 10 veces mayor que el de hígado. Este valor demuestra una menor afinidad de la enzima sanguínea por el sustrato en comparación con la hepática. Los valores de Km aparente determinados en sangre resultaron similares a los reportados en estudios con otras especies de peces (Alves Costa et al., 2007; Nakagawa K. et al., 1995) y de mamíferos (Conner y Fowler, 1994). Con respecto al Km registrado en muestras de hígado, éste resultó similar al reportado para otras

especies de peces (Conner y Fowler, 1994), pero mucho menor que el registrado en hígado de mamíferos (Wilson et al., 1972; Goering et al., 1986)

Los estudios realizados en relación a la temperatura de incubación demostraron que la enzima ALA-D de *P. lineatus* es termoestable. Las máximas actividades en ambos tejidos se registraron a temperaturas cercanas a 75 °C; siendo estos resultados similares a lo reportado para otras especies de peces (Conner y Fowler, 1994; Nakagawa K. et al., 1995); por el contrario, estudios realizados en invertebrados acuáticos y mamíferos mostraron que la enzima presentó máxima actividad a temperaturas menores, entre 55-64 °C (Sassa, 1982; Aisenberg et al., 2005).

## **II. Niveles de actividad de la enzima ALA-D en *P. lineatus* de Berazategui**

Una vez parcialmente caracterizada y optimizada la metodología para la determinación de la enzima ALA-D en muestras de sangre y de tejido hepático de *P. lineatus*, se procedió a validar su uso como parámetro biomarcador de exposición a plomo en estudios de campo. Los ejemplares fueron recolectados en tres zonas costeras a lo largo del Río de La Plata. Dos de ellas, Berazategui y Berisso, ubicadas cerca de las emisiones de residuos cloacales provenientes de las ciudades de Buenos Aires y La Plata. La tercera, Atalaya, sujeta a emisiones diversas, todas ellas, de origen antropogénico.

El primer trabajo de monitoreo estuvo concentrado en la zona de Berazategui. En este capítulo se presentan los niveles de actividad de la enzima ALA-D en muestras de sangre y tejido hepático de *P. lineatus* provenientes de esta zona. En primer lugar se analizará la variabilidad de la actividad enzimática en función de variables tales como el sexo, la época de muestreo, el tamaño y edad de los peces.

Paralelamente se determinaron los niveles de plomo en muestras de tejido hepático, branquias y sangre y su relación con los niveles de actividad de la enzima ALA-D.

### **II. 1. Niveles de actividad de la enzima ALA-D y su relación con el sexo, edad y peso corporal de los peces**

#### **II. 1. 1. Sangre**

En la Tabla 12 se presentan los valores de actividad de la enzima ALA-D en muestras de sangre de *P. lineatus* recolectados en Berazategui.

En primer lugar, se evaluaron las diferencias entre sexos para cada muestreo. La actividad de la enzima ALA-D no presentó diferencias significativas entre sexos ( $p > 0,05$ ). Estos resultados posibilitaron calcular un valor promedio total para cada muestreo.

Posteriormente se analizaron las diferencias entre los distintos muestreos para la actividad de la enzima, trabajando con los valores de actividad promedio correspondientes a ambos sexos.

La actividad de ALA-D registrada en junio de 2003 resultó significativamente menor que la correspondiente a diciembre de 2002 y febrero de 2004 ( $p < 0,05$ ).

Tabla 12. Actividad promedio en U (ml GR)<sup>-1</sup> ( $x \pm DE$ ) de la enzima ALA-D de *P. lineatus* de Berazategui.

<b>Muestreo</b>	<b>n</b>	<b>Hembras</b> <b>U.(ml GR)<sup>-1</sup></b>	<b>n</b>	<b>Machos</b> <b>U.(ml GR)<sup>-1</sup></b>	<b>n</b>	<b>Ambos sexos</b> <b>U.(ml GR)<sup>-1</sup></b>
<b>Jun-02</b>	4	683 ± 278	3	702 ± 202	7	691 ± 229 <sup>a b</sup>
<b>Jul-02</b>	4	705 ± 95	3	648 ± 133	7	680 ± 106 <sup>a b</sup>
<b>Oct-02</b>	6	624 ± 151	3	612 ± 392	9	621 ± 196 <sup>a b</sup>
<b>Dic-02</b>	4	805 ± 108	5	777 ± 214	9	789 ± 166 <sup>b</sup>
<b>Feb-03</b>	5	807 ± 365	3	572 ± 156	8	708 ± 294 <sup>a b</sup>
<b>Abr-03</b>	7	600 ± 127	3	633 ± 244	10	610 ± 156 <sup>a b</sup>
<b>Jun-03</b>	5	562 ± 91	3	480 ± 91	8	531 ± 94 <sup>a</sup>
<b>Sep-03</b>	4	613 ± 204	3	618 ± 165	7	615 ± 173 <sup>a b</sup>
<b>Dic-03</b>	4	705 ± 265	3	671 ± 194	7	691 ± 219 <sup>a b</sup>
<b>Feb-04</b>	4	937 ± 171	3	938 ± 286	7	938 ± 192 <sup>b</sup>
<b>May-04</b>	4	892 ± 347	3	636 ± 200	7	764 ± 294 <sup>a b</sup>

n = número de individuos. <sup>a b</sup> Significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Por último se analizaron mediante coeficientes de correlación las relaciones entre los niveles de actividad de la enzima y la edad y peso de los peces. El efecto de la edad sólo se estudió en individuos adultos y la misma se estimó a través de la longitud total, considerando que peces de igual longitud tienen aproximadamente la misma edad. La actividad del ALA-D no presentó correlaciones significativas ni con la edad ni con el peso corporal ( $p > 0,05$ ).

## II. 1. 2. Tejido hepático

En la tabla 13 se presentan los valores de actividad específica de la enzima ALA-D en muestras de tejido hepático. Al igual que con las muestras de sangre,

primero se evaluaron las diferencias entre sexos, para cada muestreo. La actividad específica de la enzima ALA-D no presentó diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre sexos. Por esto se calculó un valor promedio total para cada muestreo.

Tabla 13. Actividad específica promedio en U (mg prot.)<sup>-1</sup> ( $x \pm DE$ ) de la enzima ALA-D de *P. lineatus* de Berazategui.

<b>Muestreo</b>	<b>n</b>	<b>Hembras</b> <b>U (mg prot.)<sup>-1</sup></b>	<b>N</b>	<b>Machos</b> <b>U (mg prot.)<sup>-1</sup></b>	<b>n</b>	<b>Ambos sexos</b> <b>U (mg prot.)<sup>-1</sup></b>
<b>Jun-02</b>	4	3,7 ± 1,0	3	3,5 ± 0,9	7	3,6 ± 0,9
<b>Jul-02</b>	4	3,3 ± 0,3	3	4,4 ± 1,3	7	3,8 ± 1,0
<b>Oct-02</b>	6	3,6 ± 0,5	3	3,3 ± 0,8	9	3,5 ± 0,5
<b>Dic-02</b>	4	3,1 ± 0,7	5	3,2 ± 0,6	9	3,1 ± 0,6
<b>Feb-03</b>	5	3,3 ± 0,5	3	3,4 ± 0,6	8	3,3 ± 0,5
<b>Abr-03</b>	7	3,4 ± 0,6	3	3,8 ± 1,0	10	3,3 ± 0,9
<b>Jun-03</b>	5	2,9 ± 1,1	3	3,7 ± 0,7	8	3,3 ± 0,8
<b>Sep-03</b>	4	4,3 ± 1,1	3	3,5 ± 0,3	7	3,9 ± 0,8
<b>Dic-03</b>	4	3,0 ± 0,9	3	3,2 ± 0,6	7	3,1 ± 0,7
<b>Feb-04</b>	4	3,6 ± 0,6	3	3,8 ± 0,6	7	3,7 ± 0,5
<b>May-04</b>	4	3,3 ± 0,6	4	3,3 ± 0,5	8	3,3 ± 0,5
<b>Total</b>	<b>51</b>	<b>3,4 ± 0,7</b>	<b>36</b>	<b>3,5 ± 0,7</b>	<b>87</b>	<b>3,4 ± 0,7</b>

n = número de individuos

Luego se analizaron las diferencias en las actividades específicas entre los distintos muestreos trabajando con los promedios de ambos sexos. No se observaron diferencias significativas entre los distintos muestreos ( $p>0,05$ ). Esto permitió calcular un nivel de actividad promedio total.

Posteriormente se analizaron las relaciones entre los niveles de actividad de la enzima y la edad y peso de los peces. No se registraron coeficientes de correlación significativos entre estos parámetros ( $p>0,05$ ).

## II. 2. Índices morfométricos

En la tabla 14 se presentan los valores del FC e IHS de *P. lineatus*.

Tabla 14. Factor de condición e índice hepatosomático ( $x \pm DE$ ) de *P. lineatus* de Berazategui.

Muestreo		n	FC	IHS
<b>Jun-02</b>	H	4	2,9 $\pm$ 0,54	1,3 $\pm$ 0,96
	M	3	3,0 $\pm$ 0,45	1,1 $\pm$ 0,40
	AS	7	3,0 $\pm$ 0,51	1,2 $\pm$ 0,62
<b>Jul-02</b>	H	4	3,0 $\pm$ 0,20	1,3 $\pm$ 0,39
	M	3	3,4 $\pm$ 0,28	0,9 $\pm$ 0,35
	AS	7	3,1 $\pm$ 0,25	1,2 $\pm$ 0,36
<b>Oct-02</b>	H	6	3,2 $\pm$ 0,67	1,1 $\pm$ 0,24
	M	3	3,0 $\pm$ 0,19	1,3 $\pm$ 0,19
	AS	9	3,1 $\pm$ 0,58	1,1 $\pm$ 0,23
<b>Dic-02</b>	H	4	2,7 $\pm$ 0,25	1,1 $\pm$ 0,28
	M	5	3,1 $\pm$ 0,16	1,1 $\pm$ 0,16
	AS	9	2,9 $\pm$ 0,26	1,1 $\pm$ 0,21
<b>Feb-03</b>	H	5	2,9 $\pm$ 0,14	1,1 $\pm$ 0,20
	M	3	3,0 $\pm$ 0,47	0,6 $\pm$ 0,46
	AS	8	3,0 $\pm$ 0,39	0,9 $\pm$ 0,3
<b>Abr-03</b>	H	7	3,1 $\pm$ 0,33	1,3 $\pm$ 0,32
	M	3	2,9 $\pm$ 0,82	1,2 $\pm$ 0,21
	AS	10	3,1 $\pm$ 0,48	1,3 $\pm$ 0,29
<b>Jun-03</b>	H	5	3,1 $\pm$ 0,46	1,2 $\pm$ 0,32
	M	3	2,9 $\pm$ 0,61	1,3 $\pm$ 0,62
	AS	8	3,0 $\pm$ 0,50	1,2 $\pm$ 0,42
<b>Sep-03</b>	H	4	2,8 $\pm$ 0,30	1,3 $\pm$ 0,51
	M	3	3,1 $\pm$ 0,09	1,2 $\pm$ 0,46
	AS	7	2,9 $\pm$ 0,30	1,3 $\pm$ 0,47
<b>Dic-03</b>	H	4	3,3 $\pm$ 0,45	1,0 $\pm$ 0,21
	M	3	3,3 $\pm$ 0,40	1,4 $\pm$ 0,19
	AS	7	3,3 $\pm$ 0,43	1,2 $\pm$ 0,20
<b>Feb-04</b>	H	4	2,9 $\pm$ 0,32	1,2 $\pm$ 0,16
	M	3	2,7 $\pm$ 0,54	1,1 $\pm$ 0,85
	AS	7	2,9 $\pm$ 0,35	1,2 $\pm$ 0,37
<b>May-04</b>	H	4	2,9 $\pm$ 0,30	1,2 $\pm$ 0,20
	M	4	3,0 $\pm$ 0,33	1,1 $\pm$ 0,23
	AS	8	3,0 $\pm$ 0,30	1,1 $\pm$ 0,21
<b>Total</b>	H	51	2,9 $\pm$ 0,42	1,2 $\pm$ 0,38
	M	36	3,0 $\pm$ 0,43	1,2 $\pm$ 0,38
	AS	87	3,0 $\pm$ 0,42	1,2 $\pm$ 0,38

n = número de individuos; H = hembras; M = machos; AS = ambos sexos.

En un principio, para cada índice se analizaron las diferencias entre sexos de cada muestreo. Tanto el FC como el IHS no presentaron diferencias significativas entre sexos para cada muestreo ( $p>0,05$ ). Así se pudo calcular para cada índice un valor promedio total para cada muestreo.

Posteriormente se estudiaron las diferencias entre los distintos muestreos para cada índice. Para ello se trabajó con los promedios totales de cada muestreo.

El FC no mostró diferencias significativas entre los distintos muestreos ( $p>0,05$ ). Lo mismo se observó para el IHS ( $p>0,05$ ). Estos resultados posibilitaron calcular un valor promedio total para cada índice.

### **II. 3. Niveles de plomo en muestras de sangre, tejido hepático y branquias de *P. lineatus***

Los niveles de plomo, en los distintos tejidos analizados, se han graficado empleando los llamados diagramas de bloques. Sobre los bloques están representados los valores máximos y mínimos, que corresponden al rango. Cada bloque contiene en sí el 50 % de los datos, siendo sus límites los valores que representan el 25 y el 75 % del total de datos.

Previamente a la realización de los diagramas se estudiaron los niveles de plomo en relación al sexo de los peces. No se encontraron diferencias en los niveles de plomo en ninguno de los tejidos estudiados entre machos y hembras ( $p>0,05$ ). Esto posibilitó trabajar con la totalidad de los datos, sin discriminar entre sexos.

En la Fig. 22 se presentan los niveles de plomo en muestras de sangre y en la Fig. 23 en muestras de hígado y branquias de *P. lineatus* provenientes de Berazategui. Los datos están discriminados por muestreo.

Los niveles de plomo registrados en las muestras de sangre presentaron diferencias significativas, observándose una disminución durante diciembre de 2002 ( $p<0,05$ ).

Los niveles de plomo determinados en muestras de hígado y branquias presentaron en general una fluctuación similar a lo largo de los distintos muestreos.

En muestras de hígado se registraron diferencias significativas entre muestreos ( $p<0,05$ ). Los niveles de plomo presentaron un aumento desde junio de

2002 hasta diciembre de 2002, y una disminución desde junio de 2003 hasta mayo de 2004.

Con respecto a las branquias, también se observaron diferencias significativas entre los muestreos ( $p < 0,05$ ). Desde junio de 2002 hasta abril de 2003, los niveles de plomo se presentaron más o menos constantes, a excepción de un leve aumento en julio y octubre de 2002. Luego se observó un aumento progresivo hasta diciembre de 2003 y un posterior descenso hasta mayo de 2004, donde se registraron niveles similares a los observados entre junio 2002 y abril 2003.

La comparación de los niveles de plomo entre los distintos tejidos para cada muestreo mostró concentraciones más elevadas en tejido hepático, a excepción de septiembre de 2003, donde los mayores valores se registraron en branquias

#### **II. 4. Relaciones entre la actividad de ALA-D y los niveles de plomo**

En las Figs. 24, 25 y 26 se presentan las curvas de regresión de la actividad de la enzima ALA-D sanguínea en función del  $\log_{10}$  de la concentración de plomo en muestras de sangre, hígado y branquias, respectivamente.

La actividad de la enzima ALA-D en sangre presentó una correlación negativa y significativa con los niveles de plomo en sangre e hígado ( $p < 0,05$ ); sin embargo los coeficientes de correlación resultaron bajos; siendo de  $-0,40$  y  $-0,26$ , respectivamente. Los niveles de plomo en branquias no mostraron una correlación significativa con la actividad de la enzima ( $p < 0,05$ ).

En las Figs. 27, 28 y 29 se presentan las curvas de regresión de la actividad hepática en función de la concentración de plomo en sangre, hígado y branquias, respectivamente

La actividad de la enzima ALA-D en hígado no presentó una correlación significativa con ninguno de los niveles de plomo en los distintos tejidos ( $p < 0,05$ ).

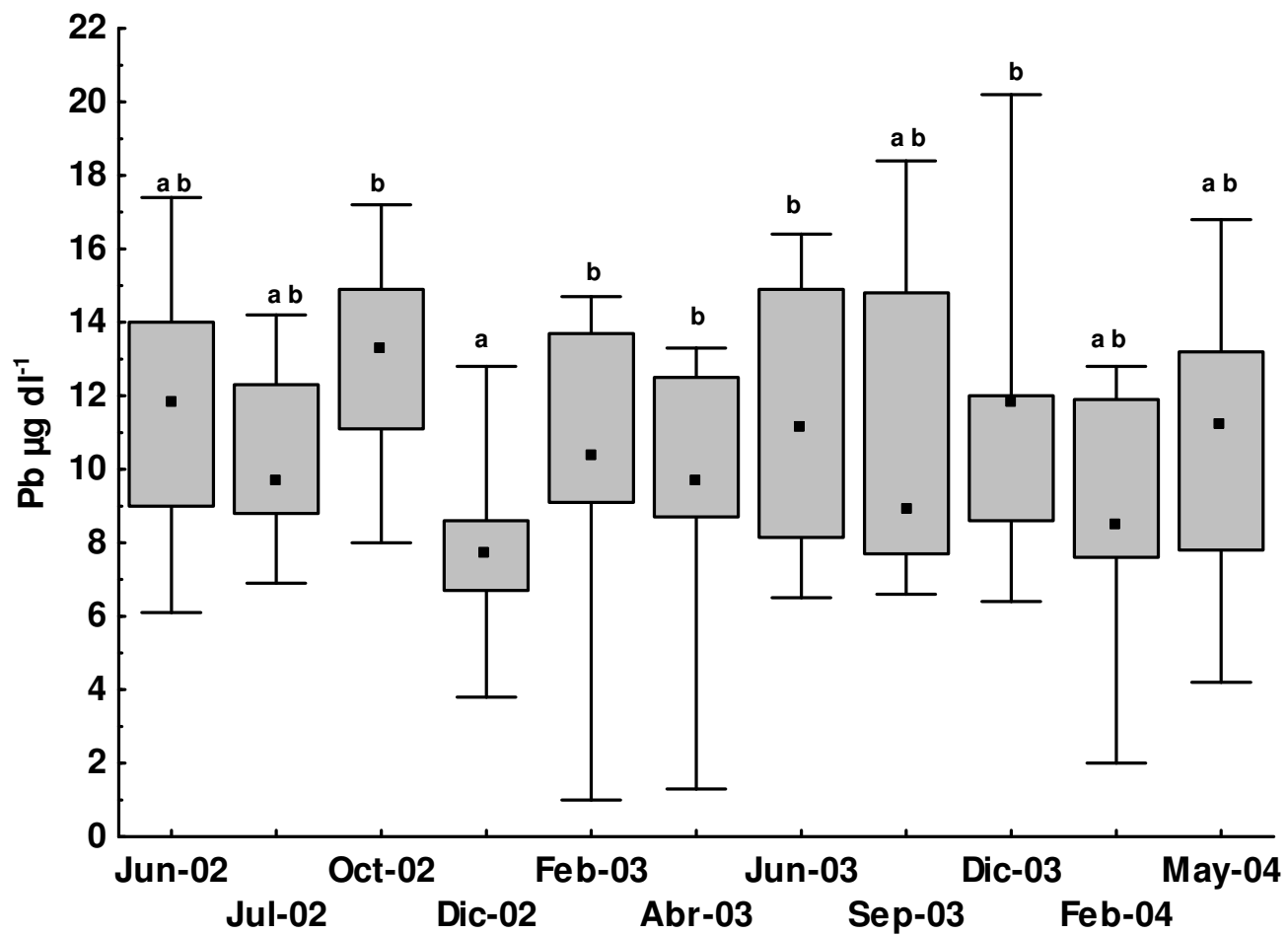


Fig. 22. Niveles de Pb en muestras de sangre ( $\mu\text{g dl}^{-1}$ ) de *P. lineatus* de Berazategui. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

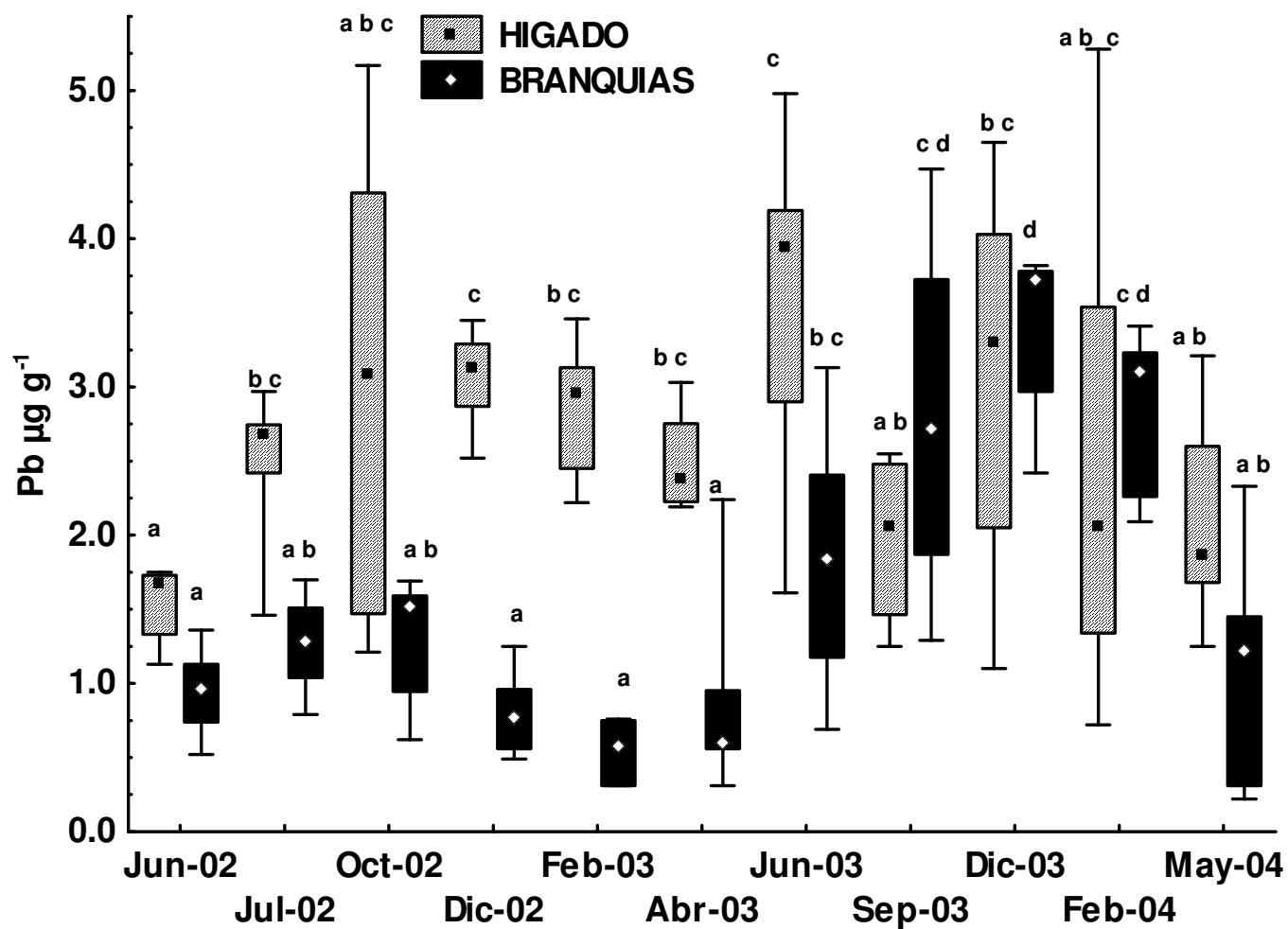


Fig. 23. Niveles de Pb en muestras de hígado y branquias ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de *P. lineatus* de Berazategui. Para el mismo tejido, letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

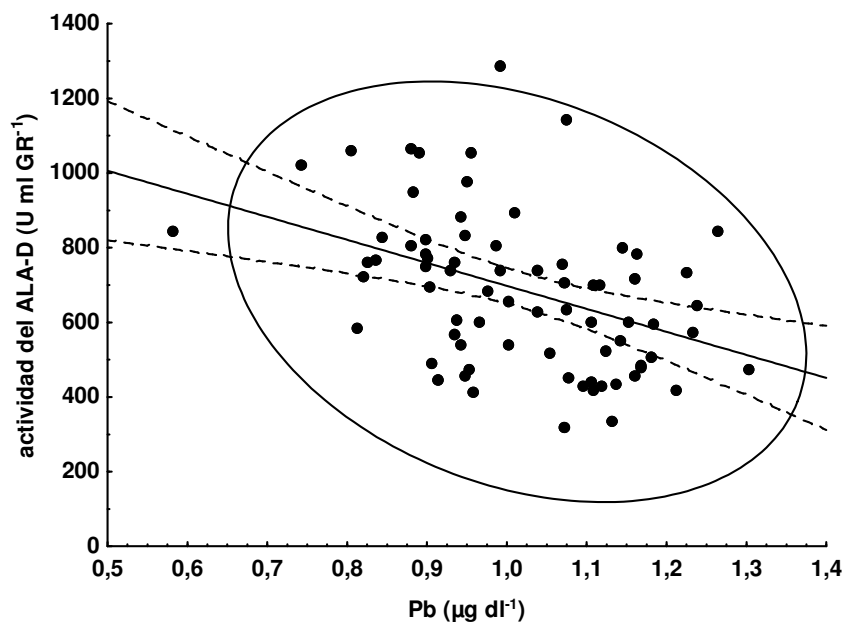


Fig. 24. Relación entre la actividad del ALA-D (U ml GR<sup>-1</sup>) en sangre y el log<sub>10</sub> de los niveles de Pb en sangre (μg dl<sup>-1</sup>) en *P. lineatus* de Berazategui [ALA-D = 1314,51 – 616,72 x Log<sub>10</sub> Pb; r<sup>2</sup> = 0,14; p = 0,0007]. Las bandas de confianza, al nivel 95% están representadas por líneas punteadas; y los intervalos de confianza por la elipse.

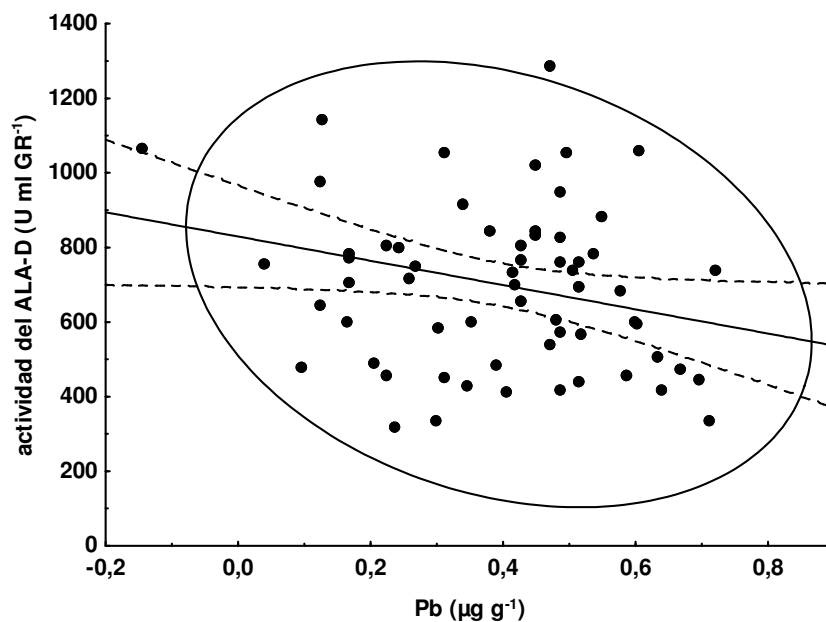


Fig. 25. Relación entre la actividad del ALA-D (U ml GR<sup>-1</sup>) en sangre y el log<sub>10</sub> de los niveles de Pb en tejido hepático (μg g<sup>-1</sup>) en *P. lineatus* de Berazategui [ALA-D = 829,20 - 325,27 x Log<sub>10</sub> Pb; r<sup>2</sup> = 0,07; p = 0,04]. Las bandas de confianza, al nivel 95% están representadas por líneas punteadas; y los intervalos de confianza por la elipse.

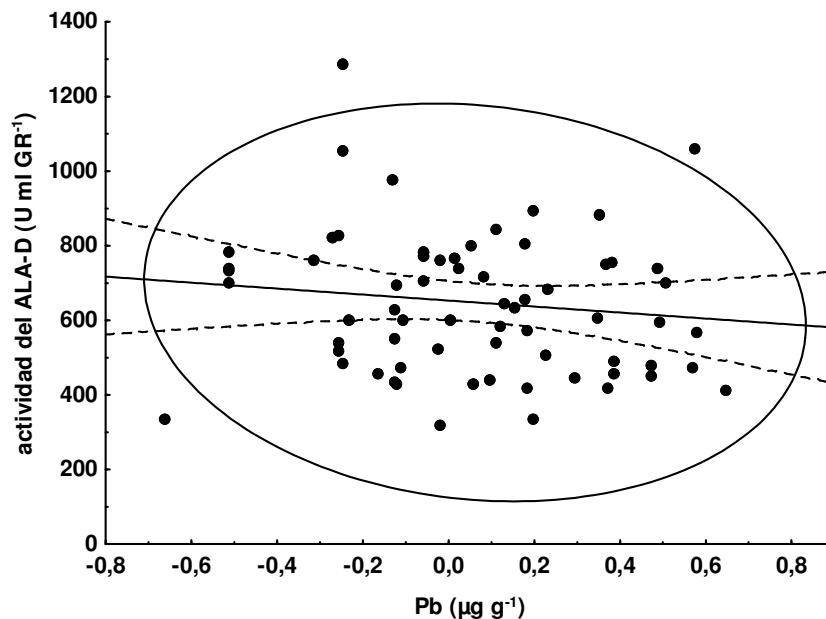


Fig. 26. Relación entre la actividad del ALA-D ( $\text{U ml GR}^{-1}$ ) en sangre y el  $\log_{10}$  de los niveles de Pb en branquias ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) en *P. lineatus* de Berazategui [ $\text{ALA-D} = 652,9319 - 80,12 \times \text{Log}_{10} \text{Pb}$ ;  $r^2 = 0,01$ ;  $p = 0,3499$ ]. Las bandas de confianza, al nivel 95% están representadas por líneas punteadas; y los intervalos de confianza por la elipse.

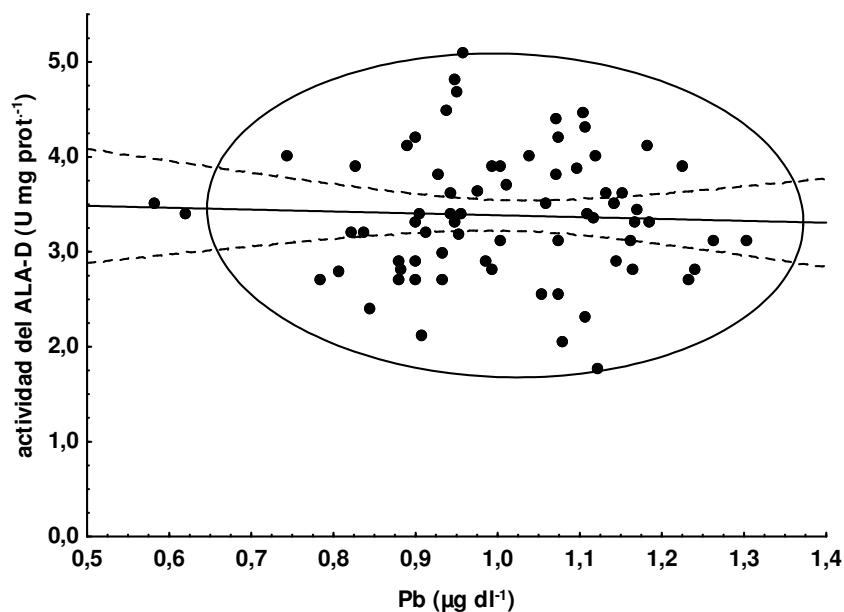


Fig. 27. Relación entre la actividad del ALA-D ( $\text{U mg prot.}^{-1}$ ) en tejido hepático y el  $\log_{10}$  de los niveles de Pb en sangre ( $\mu\text{g dl}^{-1}$ ) en *P. lineatus* de Berazategui [ $\text{ALA-D} = 3,58 - 0,20 \times \text{Log}_{10} \text{Pb}$ ;  $r^2 = 0,001$ ;  $p = 0,7301$ ]. Las bandas de confianza, al nivel 95% están representadas por líneas punteadas; y los intervalos de confianza por la elipse.

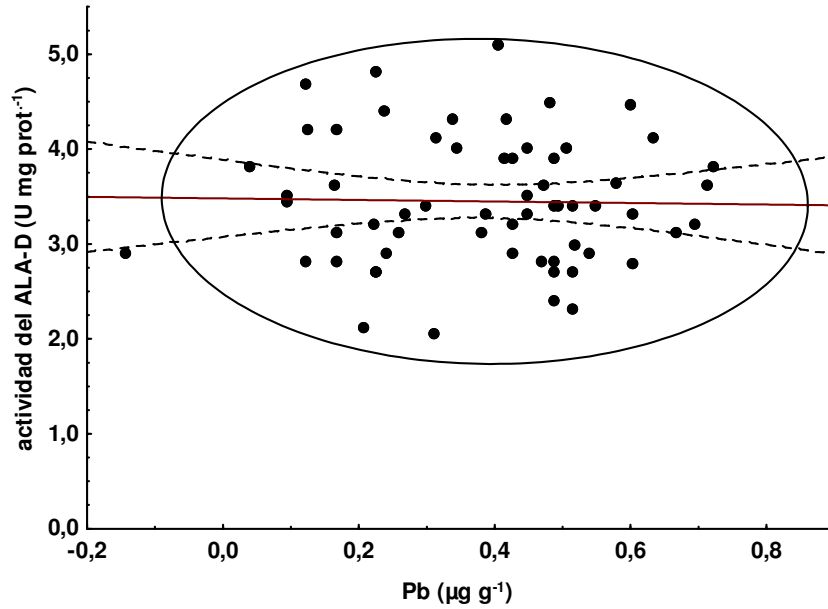


Fig. 28. Relación entre la actividad del ALA-D ( $\text{U mg prot}^{-1}$ ) en tejido hepático y el  $\log_{10}$  de los niveles de Pb en tejido hepático ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) en *P. lineatus* de Berazategui [ $\text{ALA-D} = 3,48 - 0,08 \times \text{Log}_{10} \text{Pb}$ ;  $r^2 = 0,0004$ ;  $p = 0,8648$ ]. Las bandas de confianza, al nivel 95% están representadas por líneas punteadas; y los intervalos de confianza por la elipse.

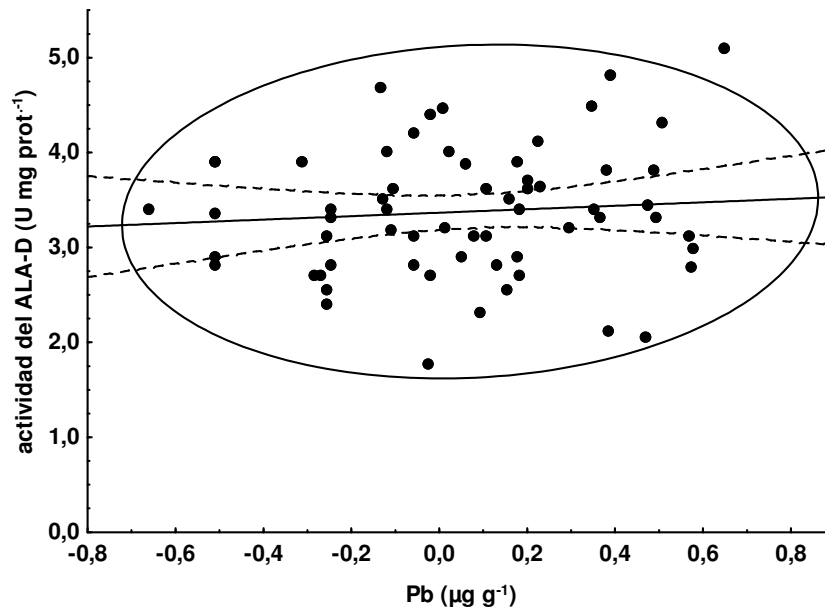


Fig. 29. Relación entre la actividad del ALA-D ( $\text{U mg prot}^{-1}$ ) en tejido hepático y el  $\log_{10}$  de los niveles de Pb en branquias ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) en *P. lineatus* de Berazategui [ $\text{ALA-D} = 3,37 + 0,18 \times \text{Log}_{10} \text{Pb}$ ;  $r^2 = 0,006$ ;  $p = 0,5295$ ]. Las bandas de confianza, al nivel 95% están representadas por líneas punteadas; y los intervalos de confianza por la elipse.

## II. 5. Discusión

Los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de sangre pusieron de manifiesto básicamente dos hechos:

a) Una considerable variabilidad de los datos con diferencias significativas en los niveles de actividad de ALA-D sanguínea entre los distintos muestreos. Sin embargo estas diferencias no mostraron ningún patrón estacional. En estudios de campo, las variaciones interindividuales pueden deberse a múltiples factores, tales como un incremento en la heterogeneidad genética, diversidad de edad y tamaño, condición nutricional, diferencias sexuales y también la influencia de otras variables naturales y antropogénicas (Mayer et al., 1992). En este caso en particular la exposición de los individuos a plomo es uno de los principales factores que condicionan la variabilidad en la actividad del ALA-D (Schmitt et al., 1993).

b) Una variabilidad menor en la actividad del ALA-D hepática sin presentar diferencias significativas entre los distintos muestreos.

En ninguno de los dos tejidos se encontraron diferencias significativas entre los peces machos y hembras. Curiosamente existen pocos estudios que hayan investigado la influencia del sexo sobre la actividad del ALA-D. Sin embargo la totalidad de estos estudios reportaron que no existen diferencias asociadas al sexo en la actividad de la enzima en sangre, tanto en peces (Larsson et al., 1985) como en aves (Dieter et al., 1976; Finley et al., 1976; Grue et al., 1984).

Con respecto a la edad y el peso corporal, tampoco se encontraron relaciones entre estos parámetros y los niveles de actividad del ALA-D en ambos tejidos. Estos resultados concuerdan con los reportados por Schmitt et al. (1984) en peces *Catostómidos* y por Blus et al. (1993) en aves.

Paralelamente se determinó la condición de los peces mediante los índices morfométricos, a fin de asegurarse un estado sanitario similar entre ellos. Los índices empleados en este trabajo fueron el factor de condición y el índice hepato-somático.

El factor de condición ha sido empleado para relacionar las consecuencias de las alteraciones bioquímicas y fisiológicas con cambios observados en los individuos y poblaciones (Goede y Burton, 1990; Sánchez et al., *in press*). Este índice puede decrecer como resultado de la acción de diversos agentes estresantes ambientales,

debido a la disminución de las reservas energéticas tales como el glucógeno hepático y la grasa corporal. Sin embargo, es sabido que las reservas energéticas también pueden fluctuar estacionalmente, como consecuencia de cambios en la actividad alimenticia y la disponibilidad de nutrientes. Además, este índice puede cambiar con el desarrollo fisiológico y la madurez sexual de los peces (Goede y Burton, 1990; Dissanayake et al., 2008).

El índice hepato-somático es otro parámetro usado comúnmente, que puede ser considerado como un indicador general de salud. Es sensible al estrés inducido por contaminantes ambientales (van der Oost et al., 2003; Almeida et al., 2005). Este índice puede decrecer como consecuencia de la disminución de las reservas energéticas hepáticas para hacer frente al estrés. Sin embargo su valor también puede incrementarse debido a varios contaminantes químicos. Este incremento es comúnmente observado con aquellas sustancias químicas que inducen hiperplasia o hipertrofia del hígado (Goede y Burton, 1990; Almeida et al., 2005). Tanto el factor de condición como el índice hepato-somático de *P. lineatus* provenientes de Berazategui no presentaron diferencias significativas estacionales. Estos resultados ponen en evidencia que los factores ambientales tales como disponibilidad de nutrientes se mantienen constantes en el tiempo, ya que la fuente principal de alimentación en esta zona está constituida por la descarga cloacal, una fuente de origen antropogénico que aporta grandes cantidades de materia orgánica a lo largo del año. Siguiendo esta línea de razonamiento también podríamos inferir que el estrés inducido por la presencia de contaminantes en esta zona resulta más o menos constante. Estudios realizados en *P. lineatus* recolectados en esta zona mostraron altos niveles de contaminantes orgánicos, tales como hidrocarburos alifáticos (Colombo et al., 2007 a) y bifenilos policlorados (Colombo et al., 2007 b) sin que se observara ningún patrón estacional. Por otro lado, tampoco se observaron diferencias significativas en los índices morfométricos entre sexos. En este sentido cabe recordar que la zona en estudio no constituye una zona de reproducción por lo que los índices no se encuentran influenciados por la madurez sexual de los peces. Este dato se corroboró a lo largo de los distintos muestreos donde en la totalidad de los especímenes recolectados nunca se evidenció cambio alguno en el grado de madurez gonadal, es decir siempre se observaron individuos sexualmente inactivos.

Así, una vez confirmado que los especímenes utilizados en este estudio se encontraban en iguales condiciones de salud, y que la variabilidad registrada en la

actividad de la enzima ALA-D no depende del estado nutricional, sexo, edad ni del peso corporal; se procedió a efectuar análisis de plomo en muestras de sangre, hígado y branquias; a fin de comprobar los niveles de bioacumulación del metal en dichos tejidos, los cuales reflejan el grado de exposición de los organismos. En todos los casos se obtuvieron valores detectables de plomo, los cuales presentaron una variabilidad aún mayor que los niveles de actividad de la enzima, sin que se registraran diferencias significativas entre machos y hembras. Si bien se encontraron diferencias significativas entre los distintos muestreos, no se obtuvieron buenas correlaciones entre los niveles de actividad de ALA-D y los niveles de plomo acumulados.

Este hecho puede resultar desconcertante, ya que se espera que un parámetro biomarcador no sólo refleje el grado de exposición y/o efecto, sino que también se correlacione con los niveles de bioacumulación. De hecho en la literatura se reporta una clara correlación entre la actividad de ALA-D y el nivel de plomo, determinados en muestras de sangre de humanos (Peakall, 1994; Gurer-Orhan et al., 2004) y de peces (Hodson, 1977; Hodson et al., 1978; Nakagawa H. et al., 1995a, 1995b, 1997a; Nakagawa K. et al., 1995). Correlaciones altamente significativas entre la actividad enzimática y la concentración de plomo bioacumulado en diversos tejidos también se han encontrado en varias especies de organismos acuáticos tales como oligoquetos, moluscos gastrópodos, etc. (Verrengia Guerrero, 1997; Aisemberg et al., 2005). Sin embargo, la mayor parte de los estudios con organismos animales se han realizado usando especies cultivadas en el laboratorio, mediante bioensayos agudos y bajo condiciones normatizadas.

Estudios realizados sobre otras especies de peces en condiciones de campo por Schmitt et al. (1984, 1993, 2007) arrojaron resultados similares a los registrados en *P. lineatus*. La concentración de plomo determinada en muestras de sangre explica sólo parcialmente la variabilidad observada en la actividad del ALA-D, pero en menor proporción que lo reportado en estudios de laboratorio.

Es indudable que en condiciones de campo, donde un mayor número de variables escapan al control del investigador, y donde la intoxicación se verifica en forma crónica a través de la interacción conjunta de varias vías de ingreso, las correlaciones no necesariamente surgen tan obvias. Pero a la vez, cabría preguntarnos si los niveles de plomo bioacumulados son suficientes como para inducir una inhibición enzimática significativa. Respecto a este punto, hay que tener

en cuenta que no todas las especies son igualmente sensibles a la acción inhibitoria del plomo (Hodson et al., 1977; Campana et al., 2003).

Por otra parte, el Río de La Plata es un sistema donde resulta virtualmente imposible encontrar una zona de referencia, que pueda considerarse como libre de contaminación. Los ríos que confluyen en su nacimiento, el Paraná y el Uruguay, también están sujetos a la liberación de numerosas descargas de contaminantes, principalmente de origen antropogénico. Por consiguiente, no era accesible recolectar ejemplares de *P. lineatus* que estuvieran libres de alguna exposición al metal, no se disponía de peces cultivados en condiciones de laboratorio para efectuar comparaciones, y además se carecía del conocimiento de los niveles basales de actividad de la enzima ALA-D como referencia.

### **III. Actividad de la enzima ALA-D en *P. lineatus*. Estudios de laboratorio**

Como pudo observarse en el capítulo II, la actividad de la enzima ALA-D sanguínea presentó una correlación negativa y significativa con los niveles de plomo en sangre y tejido hepático. Sin embargo, a partir de la actividad de la enzima resultó muy difícil estimar los efectos de la exposición a plomo en los individuos; debido a que un bajo nivel de actividad no necesariamente refleja una inhibición dependiente de plomo. Esto se debe en gran parte a la variabilidad intraespecífica que presenta la actividad de la enzima. Frente a estas dificultades se decidió encarar un estudio de exposición a plomo, empleando organismos recolectados en la naturaleza y aclimatados a las condiciones de laboratorio. El objetivo consistió en comprobar si tras un tratamiento subcrónico al metal ( $100 \mu\text{g Pb L}^{-1}$ . por 7 y 15 días) los peces era capaces de incrementar los niveles de plomo en sus tejidos y de inducir un mayor grado de inhibición enzimática. En caso afirmativo, el estudio permitiría simultáneamente investigar la posibilidad de reactivación de la enzima mediante el empleo de DDT o  $\text{Zn}^{2+}$ ; y de esta forma reducir la variabilidad intraespecífica.

Otro de los objetivos de este estudio fue analizar los efectos de la exposición a plomo sobre los parámetros hematológicos (hemoglobina y hematocrito) e índices morfométricos (factor de condición e índice hepato-somático).

En este capítulo se presentarán resultados de los estudios de exposición a plomo realizados en condiciones de laboratorio con *P. lineatus*. En primer lugar se estudiaron los distintos parámetros analizados en relación al sexo de los peces. No se encontraron diferencias por sexo en ninguno de los parámetros estudiados. Esto posibilitó trabajar con la totalidad de los datos, sin discriminar entre hembras y machos.

#### **III. 1. Niveles de actividad de la enzima ALA-D**

##### **III.1.1. Sangre**

En la Fig. 30 se presentan los niveles de actividad de la enzima ALA-D correspondientes a los peces controles y expuestos.

La actividad de la enzima ALA-D en los peces controles no presentó diferencias significativas en el tiempo ( $p>0,05$ ). La actividad enzimática de los peces expuestos no varió en el tiempo ( $p>0,05$ ) y resultó significativamente menor que la registrada en los controles ( $p<0,05$ ).

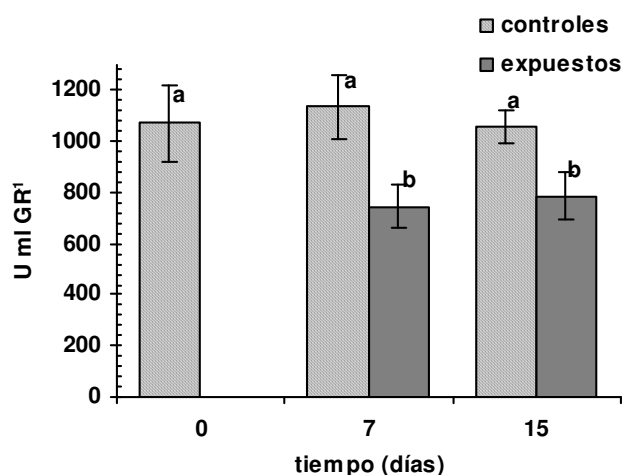


Fig. 30. Actividad de la enzima ALA-D ( $U\ ml\ GR^{-1}$ ) en *P. lineatus* controles y expuestos a tiempo 0; 7 y 15 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

### III. 1. 2. Tejido hepático

La actividad de ALA-D hepática de peces controles y expuestos se presenta en la Fig. 31.

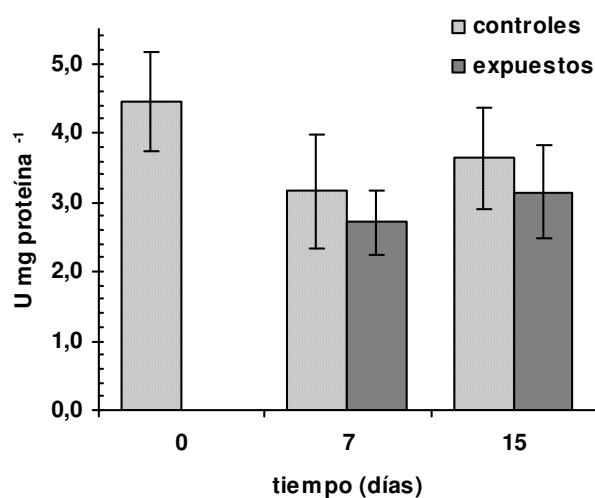


Fig. 31. Actividad específica de la enzima ( $U\ mg\ prot.^{-1}$ ) ALA-D en *P. lineatus* controles y expuestos a tiempo 0; 7 y 15 días.

En primer lugar se analizó si la actividad de la enzima ALA-D varió en el tiempo tanto para individuos controles como expuestos.

La actividad de la enzima ALA-D en tejido hepático de peces controles y expuestos no mostraron diferencias significativas en el tiempo ( $p>0,05$ ).

Luego, se analizaron las diferencias en la actividad de la enzima ALA-D entre los controles y expuestos. No se observaron diferencias significativas entre individuos controles y expuestos ( $p>0,05$ ).

### III. 2. Niveles de plomo en muestras de sangre y tejido hepático

En la Fig. 32 se presentan los niveles de plomo en muestras de sangre correspondientes a los distintos tratamientos.

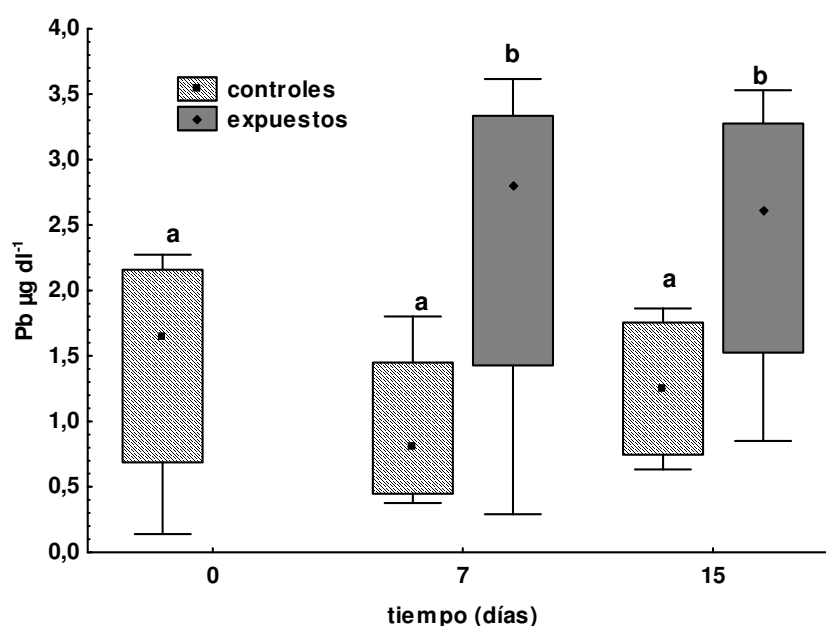


Fig. 32. Niveles de plomo ( $\mu\text{g dl}^{-1}$ ) en muestras de sangre a tiempo 0; 7 y 15 días en *P. lineatus* controles y expuestos a Pb. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

Los niveles de plomo registrados en muestras de sangre de los organismos controles presentaron una distribución similar en el tiempo ( $p>0,05$ ). Lo mismo se observó para los expuestos ( $p>0,05$ ). La comparación entre ambos grupos mostró un incremento significativo en los niveles de plomo para los peces expuestos ( $p<0,05$ ).

En la Fig. 33 se presentan los niveles de plomo registrados en muestras de tejido hepático. En este tejido se observó la misma tendencia que la reportada en sangre; los niveles de plomo en peces controles y expuestos no presentaron una distribución diferente a lo largo del tiempo ( $p > 0,05$ ) y comparando entre grupos se encontró un aumento significativo en los niveles de plomo en los organismos expuestos ( $p < 0,05$ ).

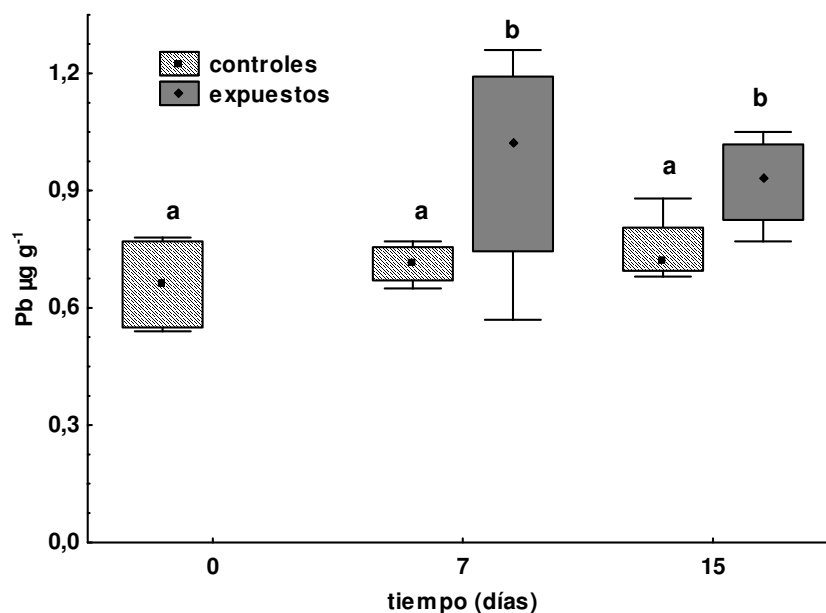


Fig. 33. Niveles de plomo ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) en muestras de tejido hepático a tiempo 0; 7 y 15 días en *P. lineatus* controles y expuestos a Pb. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### III. 3. Reactivación de la actividad de la enzima ALA-D mediante el empleo de DTT y $\text{Zn}^{2+}$

#### III. 3. 1. Sangre

##### III. 3. 1. 1. DTT

Se estudió el efecto de la concentración de DTT sobre la actividad de la enzima ALA-D en los peces expuestos considerando las actividades relativas respecto de la máxima actividad registrada. En la Fig. 34 se presentan los resultados

obtenidos, los datos se presentan agrupados ya que no se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática de los peces expuestos a plomo durante 7 y 15 días ( $p > 0,05$ ).

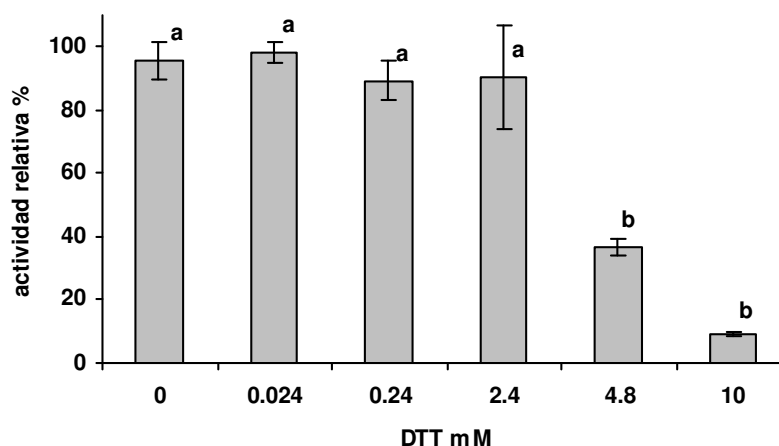


Fig. 34. Actividad relativa de la enzima ALA-D sanguínea en función de la concentración de DTT en *P. lineatus* expuestos a  $100 \mu\text{g Pb L}^{-1}$  (concentración nominal). Letras distintas corresponden a diferencias significativas con respecto al control (sin DTT;  $p < 0,05$ ).

A concentraciones de DTT hasta 2,4 mM la actividad de la enzima ALA-D se mantuvo constante, a concentraciones mayores se observó una inhibición de la actividad.

### III. 3. 1. 2. $\text{Zn}^{2+}$

El efecto de la concentración de  $\text{Zn}^{2+}$  sobre la actividad de la enzima se evaluó considerando las actividades relativas respecto del máximo valor observado.

En la Fig. 35 se presentan los resultados obtenidos con el empleo de distintas concentraciones de  $\text{Zn}^{2+}$  sobre la actividad de la enzima ALA-D en muestras de sangre de *P. lineatus* expuestos a  $100 \mu\text{g Pb. L}^{-1}$  (concentración nominal). Los datos se muestran agrupados ya que no se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática de los peces expuestos a plomo durante 7 y 15 días ( $p > 0,05$ ).

La actividad de la enzima ALA-D varió en función de la concentración de  $\text{Zn}^{2+}$ , presentando un aumento de actividad en el rango de 10 a 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  ( $p < 0,05$ ) y una subsiguiente inhibición a concentraciones mayores ( $p < 0,05$ ).

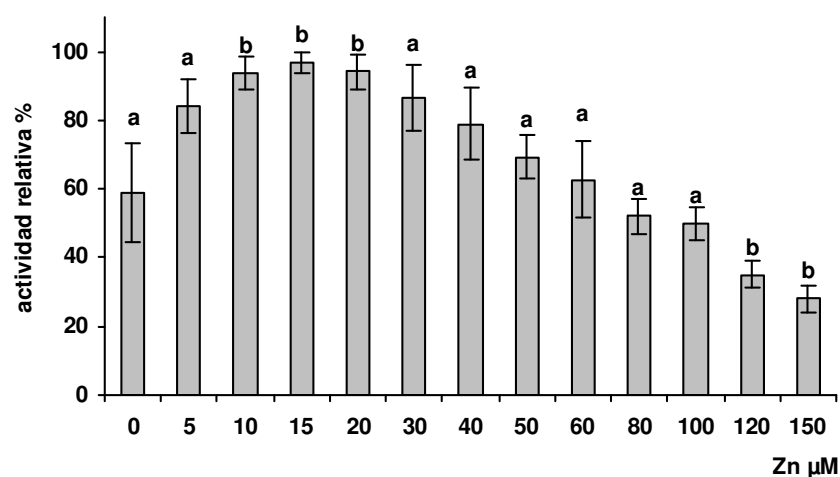


Fig. 35. Actividad relativa de la enzima ALA-D sanguínea en función de la concentración de  $\text{Zn}^{2+}$  en *P. lineatus* expuestos a  $100 \mu\text{g Pb L}^{-1}$ . Letras diferentes corresponden a diferencias significativas con respecto al control (sin  $\text{Zn}^{2+}$ ;  $p < 0,05$ )

### III. 3. 1. 3. Mezcla DTT - $\text{Zn}^{2+}$

Se estudió el efecto de la mezcla DTT 0,024 mM y concentraciones variables de  $\text{Zn}^{2+}$  de 0,24 a 100  $\mu\text{M}$  sobre la actividad de la enzima de los peces expuestos a plomo. Para ello se consideraron las actividades relativas respecto del máximo valor observado.

Las actividades del ALA-D registradas para los peces expuestos a plomo durante 7 y 15 días no presentaron diferencias significativas entre ellas ( $p > 0,05$ ). Por esto los resultados obtenidos se presentan agrupados en la Fig. 36.

La actividad de la enzima se mantuvo constante hasta una concentración de 40  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  ( $p > 0,05$ ) y a concentraciones mayores disminuye su actividad ( $p < 0,05$ ). Estos resultados indican que la presencia de DTT no potencia el efecto reactivador de  $\text{Zn}^{2+}$ , por el contrario, lo anula.

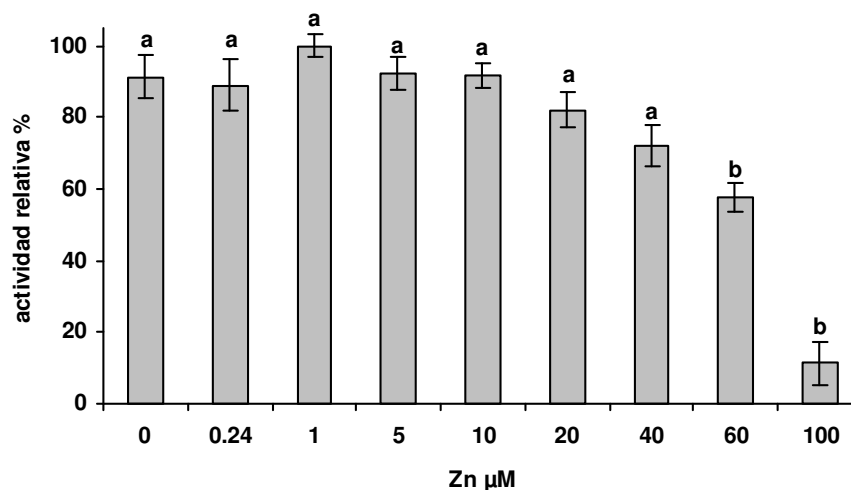


Fig. 36. Actividad relativa de la enzima ALA-D sanguínea en función de la mezcla con 0,024 mM de DTT y concentraciones de  $\text{Zn}^{2+}$  de 0,24 a 100  $\mu\text{M}$ ; en *P. lineatus* expuestos a 100  $\mu\text{g Pb L}^{-1}$ . Letras diferentes corresponden a diferencias significativas con respecto al control (sin  $\text{Zn}^{2+}$ ;  $p < 0,05$ ).

### III. 3. 2. Tejido hepático

#### III. 3. 2. 1. DTT

El efecto del DTT sobre la actividad del ALA-D en muestras de tejido hepático de los peces expuestos a Pb se estudió sobre las actividades relativas respecto al máximo valor registrado. Las actividades del ALA-D registradas para los peces expuestos a plomo durante 7 y 15 días no presentaron diferencias significativas entre ellas ( $p > 0,05$ ). Por esto los resultados obtenidos se presentan agrupados, como se muestra en la Fig. 37.

Con una concentración de DTT de 0,024 mM la actividad de la enzima ALA-D no presentó variaciones; mientras que a concentraciones mayores se observó una inhibición de la actividad.

#### III. 3. 2. 2. $\text{Zn}^{2+}$

El efecto de la concentración de  $\text{Zn}^{2+}$  sobre la actividad de la enzima se evaluó considerando las actividades relativas respecto del máximo valor observado.

En la Fig. 38 se presentan los resultados obtenidos con el empleo de distintas concentraciones de  $Zn^{2+}$  sobre la actividad de la enzima ALA-D en muestras de tejido hepático de *P. lineatus* expuestos a  $100 \mu\text{g Pb L}^{-1}$  (concentración nominal), durante 7 y 15 días. No se observaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) en la actividad enzimática entre los peces expuestos durante 7 y 15 días. Por esto, se trabajó con los promedios totales.

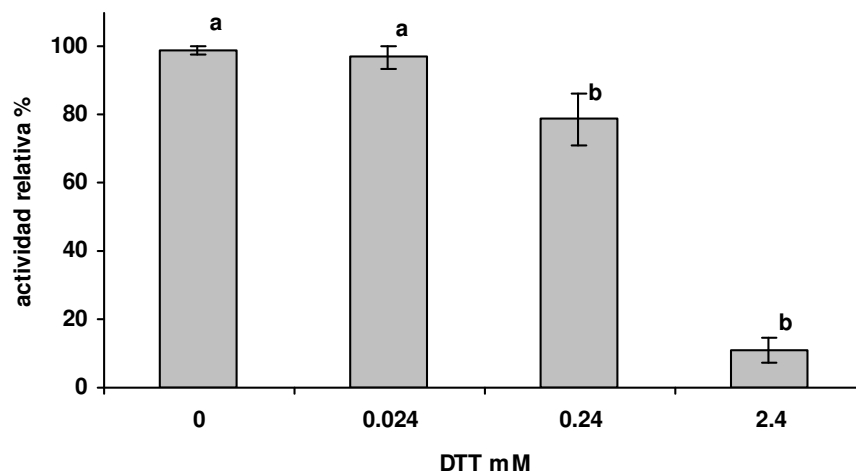


Fig. 37. Actividad relativa de la enzima ALA-D hepática en función de la concentración de DTT en *P. lineatus* expuestos a  $100 \mu\text{g Pb L}^{-1}$ . Letras distintas corresponden a diferencias significativas con respecto al control (sin DTT;  $p<0,05$ ).

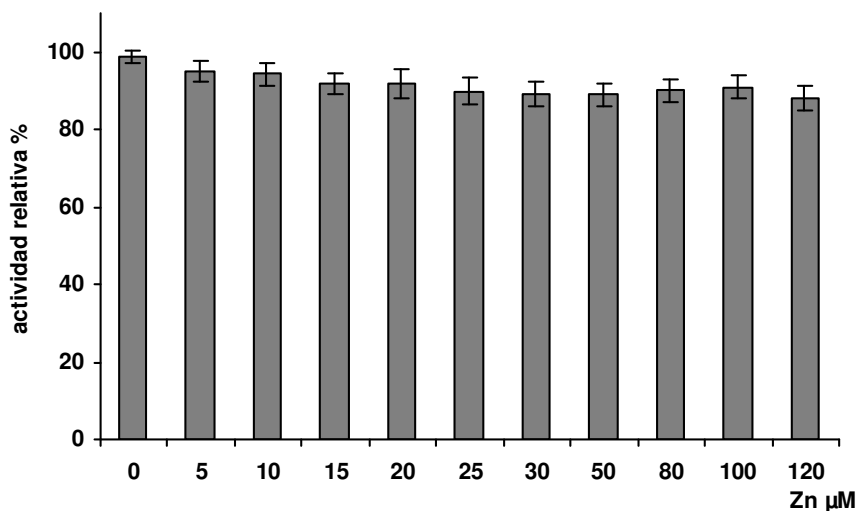


Fig. 38. Actividad relativa de la enzima ALA-D hepática en función de la concentración de  $Zn^{2+}$  en *P. lineatus* expuestos a  $100 \mu\text{g Pb L}^{-1}$ .

La actividad de la enzima ALA-D en tejido hepático, a diferencia de lo observado en sangre, no mostró una variación en función de la concentración de  $Zn^{2+}$  ( $p>0,05$ ). La actividad de la enzima ALA-D en tejido hepático no pudo ser reactivada mediante el empleo de  $Zn^{2+}$ .

### III. 4. Inhibición de la actividad de la enzima ALA-D en sangre

En base a los resultados obtenidos con DTT,  $Zn^{2+}$  y la mezcla de ambos se decidió trabajar con una concentración final de  $15 \mu M$  de  $Zn^{2+}$  para reactivar la actividad de la enzima ALA-D sólo en sangre.

Se calculó el porcentaje de inhibición (%I) de la enzima ALA-D, a partir de la relación entre la actividad en ausencia y en presencia de  $Zn^{2+}$ ; tal como se describe en la sección correspondiente a Materiales y Métodos (V. 1. 5)

En la Fig. 39 se presentan los %I de la actividad de la enzima ALA-D de *P. lineatus* controles y expuestos a plomo.

El %I de la enzima ALA-D en los individuos controles no presentó diferencias significativas entre ellos ( $p>0,05$ ). Lo mismo se observó para los organismos expuestos ( $p>0,05$ ).

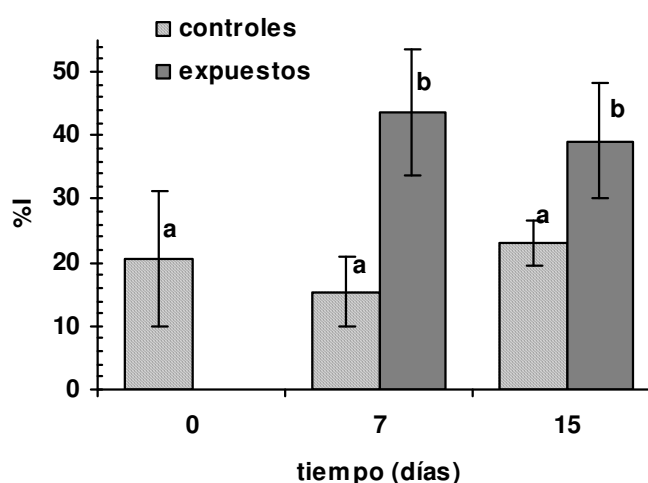


Fig. 39. Porcentaje de inhibición en % de la enzima ALA-D en sangre de *P. lineatus*. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

Posteriormente se analizaron las diferencias en el %I entre los peces controles y expuestos. El %I de la enzima ALA-D presentó diferencias significativas entre *P. lineatus* controles y expuestos a plomo disuelto ( $p < 0,05$ ).

### III. 5. Relaciones entre los niveles de plomo y la actividad de ALA-D

En la tabla 15 se presentan los coeficientes de correlación de Pearson para los niveles de plomo y la actividad de la enzima ALA-D.

Tabla 15. Coeficientes de correlación de Pearson entre los niveles de plomo y la actividad de ALA-D de *P. lineatus* expuestos a  $100 \mu\text{g Pb L}^{-1}$

		<i>Sangre</i>				<i>Hígado</i>	
		<i>ALA-D</i>	<i>ALA-D<sub>R</sub></i>	<i>%I</i>	<i>Pb</i>	<i>ALA-D</i>	<i>Pb</i>
<i>Sangre</i>	<i>ALA-D</i>	1,0					
	<i>ALA-D<sub>R</sub></i>	<b>0,74**</b>	1,0				
	<i>%I</i>	<b>-0,78**</b>	-0,04	1,0			
	<i>Pb</i>	<b>-0,94**</b>	-0,32	<b>0,87**</b>	1,0		
<i>Hígado</i>	<i>ALA-D</i>	0,43	0,17	-0,44	-0,30	1,0	
	<i>Pb</i>	-0,04	0,22	0,31	0,27	-0,42	1,0

En negrita correlación significativa \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ )

La actividad de la enzima ALA-D en sangre de *P. lineatus* presentó correlaciones significativas y negativas con el %I y con el nivel de plomo sanguíneo. Por otro lado presentó un coeficiente de correlación significativo y positivo con la actividad reactivada de la enzima ALA-D.

El %I presentó una correlación significativa y positiva con el nivel de plomo sanguíneo.

En la Fig. 40 se presenta la curva de regresión para la actividad de la enzima ALA-D en sangre en función del  $\log_{10}$  de plomo sanguíneo.

En la Fig. 41 se muestra la curva de regresión para el %I en función del nivel de plomo sanguíneo.

En *P. lineatus* expuestos a plomo disuelto los valores de  $r^2$  de las curvas de regresión entre ALA-D y el nivel de plomo en sangre; y entre el nivel de plomo sanguíneo y el %I presentaron valores elevados (0,88 y 0,75; respectivamente).

Estos resultados sugieren que existe una dependencia entre los parámetros estudiados.

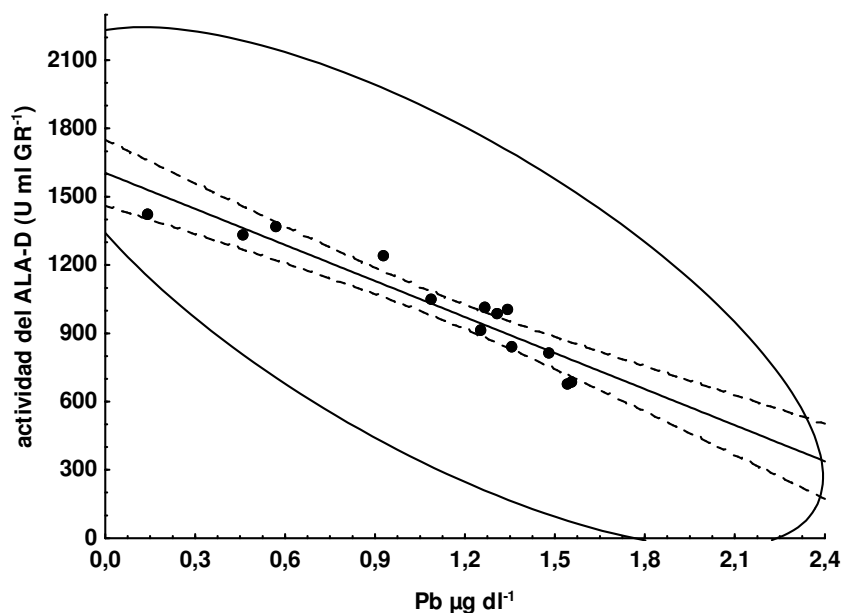


Fig. 40. Relación entre el  $\text{Log}_{10}$  Pb sanguíneo ( $\mu\text{g dl}^{-1}$ ) y ALA-D ( $\text{U ml GR}^{-1}$ ) en *P. lineatus* [ALA-D =  $1604,96 - 527,92 \times \text{Log}_{10}$  Pb;  $r^2 = 0,88$ ;  $p = 0,000001$ ]. Las bandas de confianza al nivel 95% están representadas por líneas punteadas; y los intervalos de confianza por la elipse.

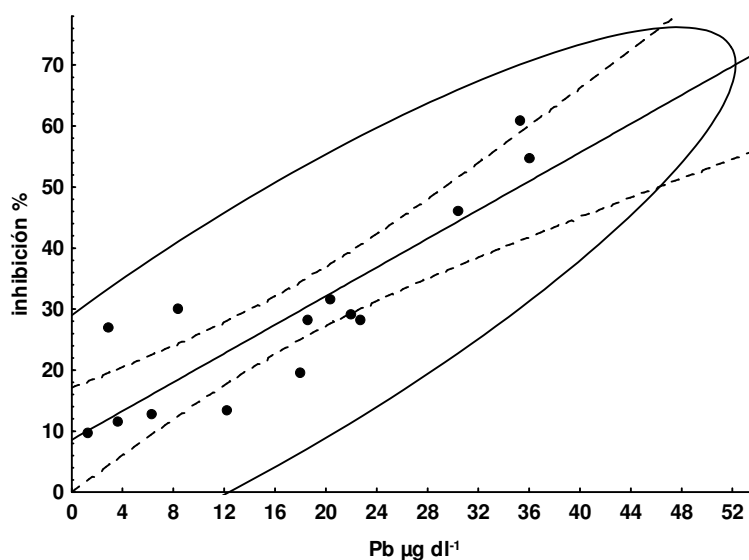


Fig. 41. Relación entre el nivel de Pb sanguíneo ( $\mu\text{g dl}^{-1}$ ) y el %I en *P. lineatus* [%I =  $8,58 + 1,18 \times \text{Pb}$ ;  $r^2 = 0,76$ ;  $p = 0,00005$ ]. Las bandas de confianza al nivel 95% están representadas por líneas punteadas; y los intervalos de confianza por la elipse.

### III. 6. Efectos del plomo sobre la actividad de ALA-D

Se analizó la relación entre el cociente ALA-D<sub>R</sub>/ALA-D y el nivel de plomo en sangre, para la cual se registró un coeficiente de correlación significativo y positivo ( $r = 0,84$ ;  $p < 0,05$ ). La línea de regresión que mostró un mejor ajuste fue lineal ( $r^2 = 0,71$ ). En la Fig. 42 se presenta dicha línea.

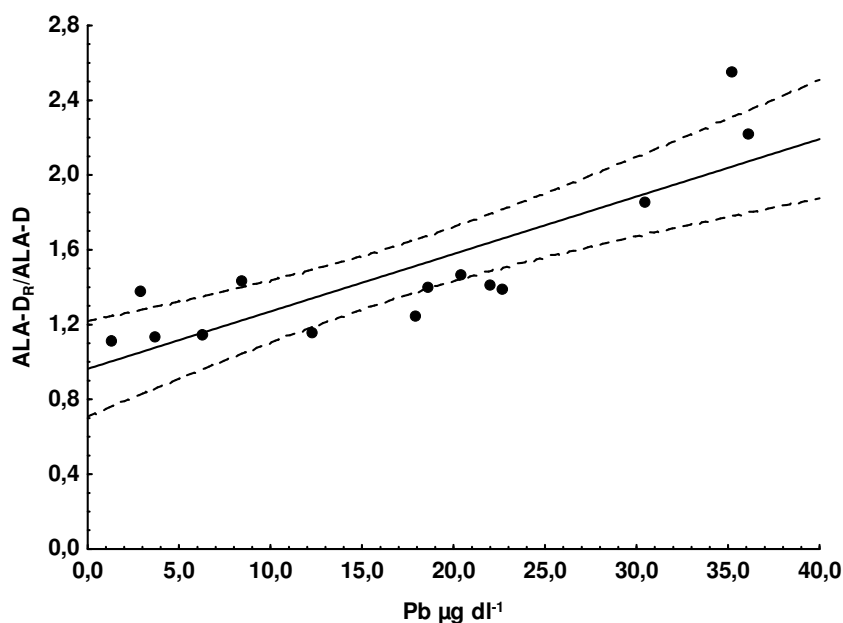


Fig. 42. Relación entre el cociente ALA-D<sub>R</sub>/ALA-D y el nivel de Pb en sangre de *P. lineatus* [ $r = 0,84$ ;  $p = 0,0002$ ;  $r^2 = 0,71$ ]. Las bandas de confianza, al nivel 95% están representadas por líneas punteadas.

La ecuación calculada por mínimos cuadrados fue:

$$\frac{ALA - DR}{ALA - D} = 0,9633 + 0,0307 \times [Pb]$$

A partir de esta ecuación se pudo estimar la concentración de plomo mínima en sangre que no produce inhibición de la enzima (NOEL) y la concentración de plomo en sangre que produce el 50 % de inhibición de la actividad de la enzima (Cl<sub>50</sub>).

Asumiendo que  $ALA-D_R/ALA-D = 1$  cuando la enzima no se encuentra inhibida. Se pudo calcular el NOEL como:

$$\frac{(1 - 0,9633)}{0,0307} = [Pb]$$

El valor de NOEL obtenido fue igual a  $1,20 \mu\text{g dl}^{-1}$ .

La  $CI_{50}$  se calculó considerando  $ALA-D_R/ALA-D = 2$ :

$$\frac{(2 - 0,9633)}{0,0307} = [Pb]$$

El valor obtenido fue igual a  $33,77 \mu\text{g dl}^{-1}$ .

### III. 7. Parámetros hematológicos

En la Fig. 43 se presentan los niveles de hemoglobina (Hb) de *P. lineatus* en los distintos tratamientos.

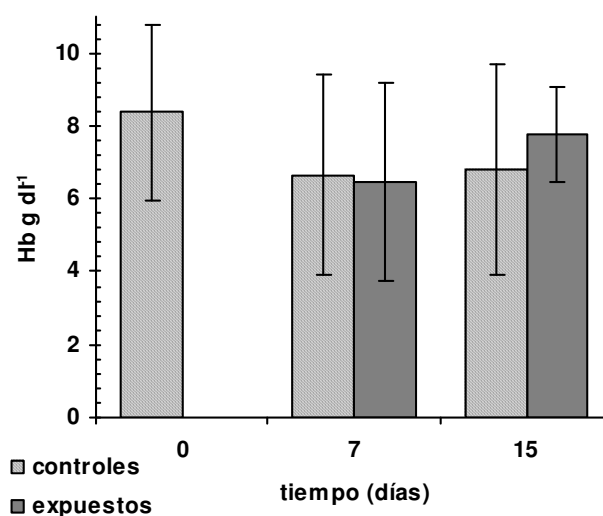


Fig. 43. Contenido de hemoglobina en *P. lineatus*.

El contenido de Hb en los individuos controles no presentó diferencias significativas en el tiempo ( $p>0,05$ ). Los individuos expuestos tampoco presentaron diferencias significativas en el contenido de Hb entre los 7 y 15 días de exposición ( $p>0,05$ ).

Posteriormente se analizaron las diferencias en el contenido de Hb entre los peces controles y expuestos. El mismo no presentó diferencias significativas entre *P. lineatus* controles y expuestos a plomo disuelto ( $p>0,05$ ).

En la Fig. 44 se presenta el hematocrito (Hct) correspondiente a los peces controles y expuestos.

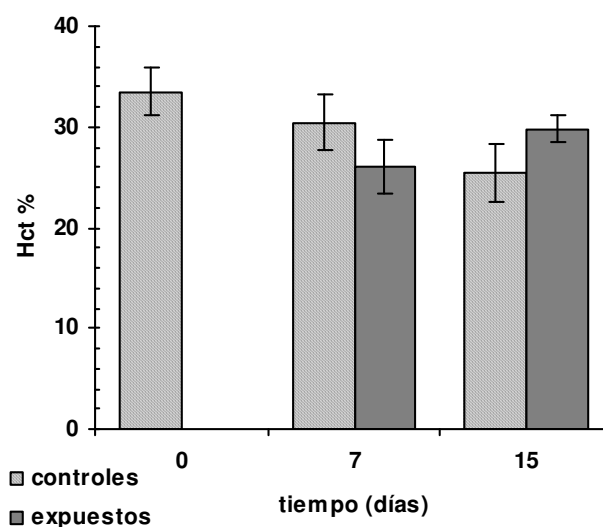


Fig. 44. Hematocrito en *P. lineatus*.

El Hct de los peces controles y expuestos no mostraron diferencias significativas en el tiempo ( $p>0,05$ ). Posteriormente se analizaron las diferencias entre individuos controles y expuestos para el Hct. No se observaron diferencias significativas entre controles y expuestos ( $p>0,05$ ).

### III. 8. Índices morfométricos

En la Fig. 45 se presenta el factor de condición (FC) para *P. lineatus* controles y expuestos a plomo.

El FC de los peces controles y expuestos no mostró diferencias significativas en el tiempo ( $p>0,05$ ). Tampoco se observaron diferencias significativas para este índice entre peces controles y expuestos ( $p>0,05$ ).

En la Fig. 46 se muestra el índice hepato-somático (IHS) para *P. lineatus* en los distintos tratamientos.

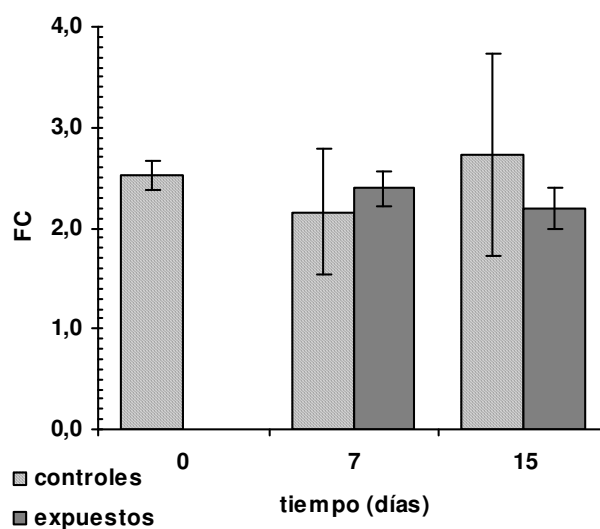


Fig. 45. Factor de condición en *P. lineatus*.

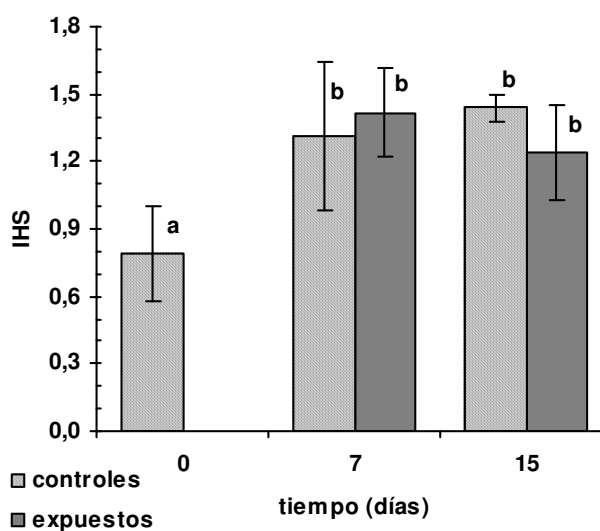


Fig. 46. Índice hepatosomático en *P. lineatus*. Letras distintas corresponden a diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

En este caso, el IHS de los peces controles a tiempo 0 presentó diferencias significativas con el resto de los controles y con los peces expuestos ( $p < 0,05$ ).

### III. 9. Parámetros hematológicos e índices morfométricos y su relación con la actividad del ALA-D y el nivel de plomo

En la Tabla 16 se presentan los coeficientes de correlación de Pearson para los parámetros hematológicos e índices morfométricos con la actividad de la enzima ALA-D y los niveles de plomo.

Tabla 16. Coeficientes de correlación de Pearson para los parámetros hematológicos e índices morfométricos con la actividad de la enzima ALA-D y los niveles de plomo.

		<i>Hb</i>	<i>Hct</i>	<i>FC</i>	<i>IHS</i>
<i>Sangre</i>	<i>ALA-D</i>	-0,16	-0,18	-0,14	-0,30
	<i>%I</i>	0,22	0,24	0,10	0,37
	<i>Pb</i>	0,48	<b>0,58</b>	0,26	0,29
<i>Hígado</i>	<i>ALA-D</i>	0,10	0,15	0,17	<b>-0,56</b>
	<i>Pb</i>	0,05	-0,03	-0,23	0,34

En negrita correlación significativa ( $p < 0,05$ ).

El Hct presentó un coeficiente de correlación significativo positivo con el nivel de plomo sanguíneo ( $p < 0,05$ ).

La actividad de la enzima ALA-D en hígado presentó un coeficiente de correlación significativo negativo con el IHS ( $p < 0,05$ ).

### III. 10. Discusión

Los resultados obtenidos mediante los ensayos de exposición en laboratorio evidenciaron algunos aspectos importantes:

a) En muestras de sangre el efecto de una exposición subcrónica a plomo se evidencia rápidamente, ya que a los 7 días se registraron menores actividades enzimáticas en los peces expuestos y este nivel de actividad se mantuvo hasta los 15 días. Por otro lado, no se observaron variaciones a lo largo del tiempo en la

actividad enzimática registrada en los peces controles. Esto último sugiere que la actividad del ALA-D no se recupera rápidamente cuando los peces son transferidos a agua libre de plomo. Resultados similares para otras especies de peces fueron registrados mediante estudios de laboratorio en *Oncorhynchus mykiss* (Hodson et al., 1977; Johansson-Sjöbeck y Larsson, 1979), *Salvelinus fontinalis* (Hodson et al., 1977), *Cyprinus carpio* (Nakagawa H. et al., 1995a) y *Carassius auratus langsdorfii* (Nakagawa H. et al., 1997a).

b) Los niveles de plomo corroboran lo observado con la actividad de la enzima ALA-D en sangre. Se registró una mayor acumulación de este metal en los organismos expuestos, que no aumenta a los 15 días. Por otra parte, en los controles no se observó una disminución en los niveles de plomo en el tiempo.

Con respecto a la actividad de la enzima en muestras de tejido hepático no se observaron diferencias entre organismos controles y expuestos como tampoco a lo largo del tiempo.

Una vez confirmado que en los peces expuestos la actividad de la enzima ALA-D en sangre se encontraba inhibida y existen mayores niveles de plomo con respecto a los valores registrados en campo se procedió al desarrollo de la técnica de reactivación de la enzima.

Según la literatura, la inhibición de la enzima ALA-D puede en algunos casos revertirse por medio de iones  $Zn^{2+}$ , de agentes protectores de grupos sulfhidrilos, tales como el ditioneitol (DTT) o bien por una combinación de ambos (Yagminas Villeneuve, 1987).

Los resultados obtenidos con el uso de DTT en muestras de sangre de *P. lineatus* fueron negativos, observándose inhibición de la enzima a concentraciones de DTT superiores a 2,4 mM. Esta concentración es muy inferior a la utilizada para la reactivación de la enzima en mamíferos (20 mM). Por otro lado, la actividad del ALA-D mostró una dependencia en función de la concentración de  $Zn^{2+}$ ; mientras que la mezcla DTT- $Zn^{+2}$  tampoco mostró resultados positivos; observándose que la presencia de DTT anula el efecto reactivador del  $Zn^{+2}$ . La enzima ALA-D requiere grupos tioles para cumplir su actividad catalítica, siendo éstos particularmente sensibles al oxígeno. Así, para desarrollar su actividad máxima la enzima requiere de la presencia de agentes reductores de los grupos tioles. El DTT cumple esta función (Rocha et al., 2004). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que

para los tejidos de *P. lineatus* en estudio no existe una pérdida de actividad en la enzima ALA-D debida a la oxidación de los grupos SH presentes en la misma.

La reactivación de la actividad de la enzima ALA-D en sangre de *P. lineatus* se verificó en un rango de concentración óptima de 10 - 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$ . Estas concentraciones se encuentran muy por debajo de las reportadas en mamíferos, donde la concentración óptima de  $\text{Zn}^{2+}$  para la reactivación del ALA-D sanguínea se encuentra entre 90-100  $\mu\text{M}$  (Granick et al, 1973; Finelli et al, 1974; Yagminas y Villeneuve, 1987). Por el contrario, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que concentraciones de  $\text{Zn}^{2+}$  entre 90-100  $\mu\text{M}$  tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima ALA-D de peces.

A diferencia de lo observado en sangre, en hígado no se registró un aumento de actividad enzimática para ninguna de las concentraciones de  $\text{Zn}^{2+}$  estudiadas. Similares observaciones fueron reportadas en otras especies de peces por Gonzalez et al. (1987), Rodríguez et al. (1989) y Conner y Fowler (1994).

Las diferencias observadas evidentemente están relacionadas con diferencias en la estructura de la enzima. Como se describió en la introducción, el ALA-D de mamíferos es una enzima  $\text{Zn}^{2+}$  dependiente y particularmente sensible al efecto inhibitorio del plomo, éste puede desplazar al  $\text{Zn}^{2+}$  del sitio activo y así afectar la actividad de la enzima (Jaffe et al, 2001). Su afinidad por el plomo es 25 veces superior a la del  $\text{Zn}^{2+}$ , y ambos metales compiten por el mismo sitio de unión (Simons, 1995). Así, la inhibición debida a plomo puede revertirse por agregado de  $\text{Zn}^{2+}$  (Finelli et al, 1975). La actividad de la enzima ALA-D en sangre de peces también mostró una dependencia en función de la concentración de  $\text{Zn}^{2+}$ . En este caso la enzima requiere de la presencia de  $\text{Zn}^{2+}$  como cofactor, pero en menor proporción que en mamíferos; posiblemente porque el sitio activo de la enzima posee menos zonas de unión a  $\text{Zn}^{2+}$ . Otra probable explicación es que la afinidad de la enzima por el  $\text{Zn}^{2+}$  es mayor que la observada en mamíferos. Con referencia a la enzima hepática, no mostró variaciones de actividad en relación a la presencia de  $\text{Zn}^{2+}$ . Estos datos sugieren que el sitio activo de la enzima hepática podría estar saturado con  $\text{Zn}^{2+}$  mediante uniones más estables que en mamíferos o sangre de peces; o que el  $\text{Zn}^{2+}$  no es un cofactor de la enzima hepática (Conner y Fowler, 1994).

De acuerdo a los resultados obtenidos con el empleo de DTT y  $\text{Zn}^{2+}$  se procedió a reactivar la actividad de la enzima ALA-D en muestras de sangre

utilizando una concentración final de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$ . La determinación de la actividad reactivada de la enzima resaltó los siguientes aspectos:

a) El porcentaje de inhibición en los peces expuestos a plomo resultó significativamente mayor que el de los controles. Estos resultados refuerzan lo registrado con la actividad de la enzima ALA-D: inhibición evidente por lo menos a los 7 días, la cual bajo iguales condiciones de exposición se mantiene constante a lo largo del tiempo y ausencia de recuperación en los peces no expuestos, por lo menos en el lapso estudiado.

b) El porcentaje de inhibición mostró una buena regresión lineal con el nivel de plomo sanguíneo. Esto demuestra que la técnica de reactivación refleja los efectos de la exposición a plomo. Por otro lado, la actividad de la enzima no reactivada también presentó una buena correlación con el nivel de plomo sanguíneo, mucho mejor que lo registrado en campo para *P. lineatus* de Berazategui. Esto puede deberse al hecho de exponer a los peces a concentraciones de plomo superiores a las encontradas en el ambiente donde vive esta especie. Por otro lado, es posible que el pez no pudiera adaptarse a las nuevas condiciones durante el tiempo que duró el bioensayo, a diferencia de lo que ocurre bajo condiciones de exposición crónica en el ambiente natural.

La reactivación de la actividad de la enzima también brindó la posibilidad de estimar la concentración de plomo mínima en sangre que no produce inhibición observable de la enzima (NOEL) y la concentración de plomo en sangre que produce el 50 % de inhibición de la actividad de la enzima ( $\text{Cl}_{50}$ ), las cuales fueron de 1,20  $\mu\text{g Pb dl}^{-1}$  y 33,77  $\mu\text{g Pb dl}^{-1}$ , respectivamente. Estos resultados son similares a los registrados para *Cyprinus carpio* donde el NOEL fue de aproximadamente 2,00  $\mu\text{g Pb dl}^{-1}$  y la  $\text{Cl}_{50}$  de 30  $\mu\text{g Pb dl}^{-1}$  (Nakagawa H. et al., 1995a); mientras que para *Salmo gairdneri* ambos parámetros resultaron mayores, aproximadamente 9,00  $\mu\text{g Pb dl}^{-1}$  y 55  $\mu\text{g Pb dl}^{-1}$ , respectivamente (Hodson et al., 1978). En invertebrados acuáticos también se encontraron diferencias apreciables en relación a la sensibilidad del ALA-D con respecto a la bioacumulación de plomo. En el oligoqueto *Lumbriculus variegatus* la concentración de plomo que produce la inhibición del ALA-D en un 50 % es aproximadamente 90  $\mu\text{g Pb g}^{-1}$ , mientras que en moluscos gastrópodos *Biomphalaria glabrata* es unas 5 veces menor (Aisemberg et al., 2005).

Otro de los objetivos de los ensayos de laboratorio fue determinar si la exposición a plomo afecta los parámetros hematológicos básicos, tales como la concentración de hemoglobina y el hematocrito, y a los índices morfométricos.

Los parámetros hematológicos no mostraron diferencias entre los tratamientos. Hay muchos reportes en los cuales se investigó la relación entre la exposición a plomo y el contenido de hemoglobina, pero los resultados son contradictorios. La exposición de *Salmo gairdneri* a 300  $\mu\text{g Pb L}^{-1}$  en agua provocó una disminución de la actividad de ALA-D (86%) y del contenido de hemoglobina (18%) (Johansson-Sjöbeck y Larsson, 1979; Haux y Larsson, 1982), mientras que una concentración similar de plomo inhibió al ALA-D pero no provocó cambios hematológicos en *Anguilla anguilla* (Santos y Hall, 1990). En *Mugil auratus* (Krajnovic-Ozretic y Ozretic, 1980) se observó una disminución en la actividad de ALA-D y en el contenido de hemoglobina como consecuencia de la exposición a 500  $\mu\text{g Pb L}^{-1}$ . Es posible que este efecto sea una respuesta a largo plazo, o a niveles de plomo más elevados que los registrados en estos peces. Los estudios de campo podrían aclarar esta cuestión. Por otro lado, estudios realizados en anfibios no mostraron una disminución en el contenido de hemoglobina en *Bufo arenarum* expuestos a una dosis de 10 mg Pb Kg<sup>-1</sup> (Peri et al., 1998), mientras que en aves una dosis de 25 mg Pb Kg<sup>-1</sup> provocó una disminución en el contenido de hemoglobina (Hoffman et al., 1985), por el contrario, en otras especies expuestas a dosis similares no se encontró tal relación (Berisha et al., 1994; Blus et al., 1995)

El hematocrito es el único parámetro que presentó una correlación significativa con el nivel de plomo sanguíneo. Esto puede deberse a que este metal promueve la eritropoyesis por destrucción de glóbulos rojos maduros, al formarse mayor cantidad de glóbulos inmaduros podría llegar a aumentar el porcentaje de glóbulos rojos totales (Hodson et al., 1978). La única forma de comprobar esto hubiera sido un análisis histológico de un extendido de sangre para determinar el estado de maduración de los glóbulos rojos.

En cuanto a los índices morfométricos, el factor de condición no varió entre los tratamientos. Estos resultados demostraron que los peces mantuvieron su peso a lo largo de la exposición. Por otro lado el índice hepato-somático aumentó tanto en controles como en expuestos a los 7 y a los 15 días. El índice en los organismos a tiempo cero resultó extrañamente bajo en comparación con los valores de base registrados en campo.

## **IV. Inhibición de la actividad de la enzima ALA-D en *P. lineatus* de Berazategui**

Los resultados obtenidos en el capítulo II mostraron que no existe una clara correlación entre el nivel de actividad de ALA-D y el contenido de plomo en los peces provenientes de Berazategui. En consecuencia se plantean tres posibilidades: la enzima se encontraba totalmente inhibida; los peces habían desarrollado algún tipo de tolerancia, o bien, la gran variabilidad intraespecífica en la actividad de la enzima ALA-D enmascara los efectos de la exposición a plomo.

Los estudios de laboratorio (Capítulo III) aclararon algunos aspectos sobre la actividad de la enzima ALA-D en *P. lineatus* de estudios de campo. Por un lado mostraron que los niveles de actividad de la enzima ALA-D en sangre de *P. lineatus* provenientes de Berazategui se encuentran por debajo del nivel de actividad basal, y que el grado de inhibición registrado no es el máximo posible. Paralelamente, los resultados obtenidos en el capítulo III mostraron que la actividad de la enzima ALA-D en sangre de *P. lineatus* puede ser reactivada mediante el empleo de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$ .

Frente a estos resultados se procedió a reactivar la actividad de la enzima en sangre de *P. lineatus* de Berazategui

Los estudios sobre el grado de inhibición de la enzima ALA-D en sangre de *P. lineatus* provenientes de Berazategui y su relación con los niveles de plomo determinados en tejido hepático, branquias y sangre se presentan a continuación.

### **IV. 1. Niveles de actividad reactivada y porcentaje de inhibición de la enzima ALA-D en muestras de sangre**

En la tabla 17 se presentan los valores correspondientes a la actividad de  $\text{ALA-D}_R$  y el %I de la enzima en *P. lineatus* provenientes de Berazategui.

En primer lugar se evaluaron las diferencias entre sexos para cada muestreo. La actividad de  $\text{ALA-D}_R$  no presentó diferencias significativas entre sexos ( $p > 0,05$ ). Estos resultados posibilitaron calcular un valor promedio total para cada muestreo.

Posteriormente se analizaron las diferencias entre los distintos muestreos. La actividad de  $\text{ALA-D}_R$  no presentó diferencias significativas entre los distintos muestreos ( $p > 0,05$ ).

Paralelamente se analizaron las diferencias entre la actividad de ALA-D (Capítulo II) y ALA-D<sub>R</sub> para cada muestreo. La actividad de la enzima ALA-D resultó significativamente diferente de la actividad reactivada en todos los muestreos ( $p < 0,05$ ). En consecuencia se calculó el %I.

Tabla 17. Actividad reactivada promedio ( $\bar{x} \pm DE$ ) de la enzima ALA-D de *P. lineatus* de Berazategui.

<b>Muestreo</b>	<b>n</b>	<b>Hembras</b> <b>U. (ml GR)<sup>-1</sup></b>	<b>n</b>	<b>Machos</b> <b>U. ( ml GR)<sup>-1</sup></b>	<b>n</b>	<b>Ambos sexos</b> <b>U. ( ml GR)<sup>-1</sup></b>
<b>Jun-02</b>	4	1159 ± 411	3	1128 ± 156	7	1146 ± 305
<b>Jul-02</b>	4	1099 ± 173	3	1064 ± 45	7	1084 ± 127
<b>Oct-02</b>	6	1083 ± 257	3	981 ± 458	9	1057 ± 282
<b>Dic-02</b>	4	992 ± 83	5	963 ± 134	9	976 ± 108
<b>Feb-03</b>	5	1169 ± 381	3	949 ± 120	8	1068 ± 301
<b>Abr-03</b>	7	876 ± 133	3	940 ± 203	10	895 ± 148
<b>Jun-03</b>	5	1129 ± 160	3	1042 ± 99	8	1097 ± 140
<b>Sep-03</b>	4	991 ± 266	3	980 ± 39	7	986 ± 190
<b>Dic-03</b>	4	936 ± 284	3	944 ± 146	7	940 ± 218
<b>Feb-04</b>	4	1188 ± 145	3	1165 ± 226	7	1180 ± 160
<b>May-04</b>	4	1304 ± 422	3	902 ± 380	7	1103 ± 432

n = número de individuos.

En la Tabla 18 se presentan los %I correspondientes a cada muestreo y a cada sexo. Los %I presentaron diferencias significativas entre los muestreos ( $p < 0,05$ ). Observándose la mayor inhibición en junio de 2003.

## IV. 2. Relaciones entre los parámetros estudiados

En la Fig. 47 se presenta la curva de regresión de la actividad de ALA-D en función del %I, la cual presentó un coeficiente de correlación significativo y negativo ( $r = - 0,69$ ;  $p < 0,05$ ).

Por su parte, en la Fig. 48 se muestra la curva de regresión para el %I en función del nivel de plomo sanguíneo, para la cual se registró un coeficiente de correlación significativo y positivo ( $r = 0,70$ ;  $p < 0,05$ ).

Tabla 18. Porcentaje de inhibición promedio ( $\bar{x} \pm DE$ ) de la enzima ALA-D de *P. lineatus* de Berazategui.

<i>Muestreo</i>	<i>n</i>	<i>Hembras</i> %	<i>n</i>	<i>Machos</i> %	<i>N</i>	<i>Ambos sexos</i> %
<i>Jun-02</i>	4	41 ± 9	3	37 ± 10	7	40 ± 9 <sup>ab</sup>
<i>Jul-02</i>	4	35 ± 14	3	39 ± 14	7	37 ± 13 <sup>ab</sup>
<i>Oct-02</i>	6	42 ± 11	3	41 ± 12	9	41 ± 10 <sup>ab</sup>
<i>Dic-02</i>	4	19 ± 4	5	20 ± 17	9	20 ± 12 <sup>a</sup>
<i>Feb-03</i>	5	33 ± 12	3	40 ± 13	8	35 ± 11 <sup>ab</sup>
<i>Abr-03</i>	7	31 ± 12	3	34 ± 11	10	32 ± 11 <sup>a</sup>
<i>Jun-03</i>	5	50 ± 6	3	54 ± 11	8	51 ± 7 <sup>b</sup>
<i>Sep-03</i>	4	38 ± 12	3	37 ± 15	7	36 ± 13 <sup>ab</sup>
<i>Dic-03</i>	4	25 ± 10	3	29 ± 14	7	27 ± 11 <sup>a</sup>
<i>Feb-04</i>	4	23 ± 15	3	20 ± 9	7	21 ± 14 <sup>a</sup>
<i>May-04</i>	4	32 ± 5	3	25 ± 15	7	28 ± 12 <sup>a</sup>

n = número de individuos. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

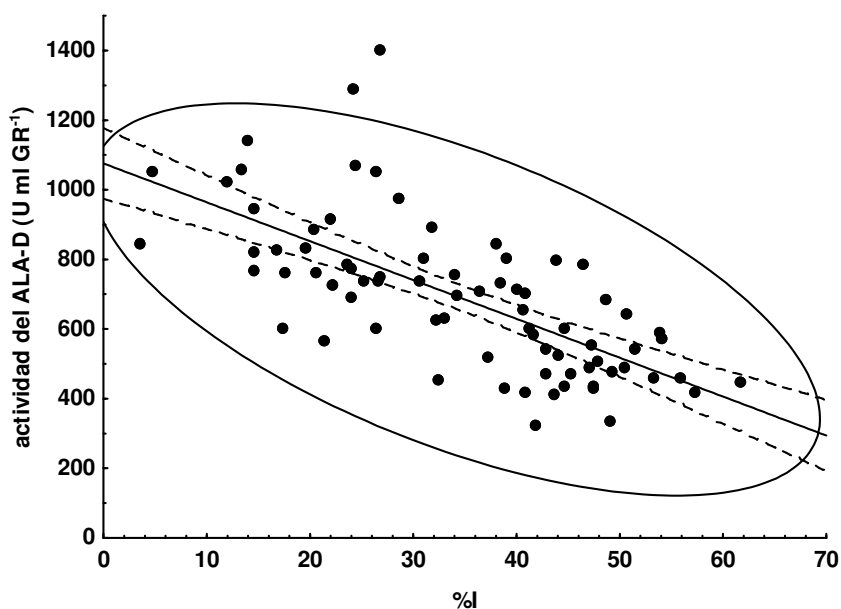


Fig. 47. Relación entre la actividad de ALA-D ( $U mL GR^{-1}$ ) y %I (%) en *P. lineatus* [ $\bar{Y} = 1075,73 - 11,17 \times \%I$ ;  $r^2 = 0,48$ ;  $p = 0,00001$ ]. Las bandas de confianza, al nivel 95% están representadas por líneas punteadas; y los intervalos de confianza por la elipse.

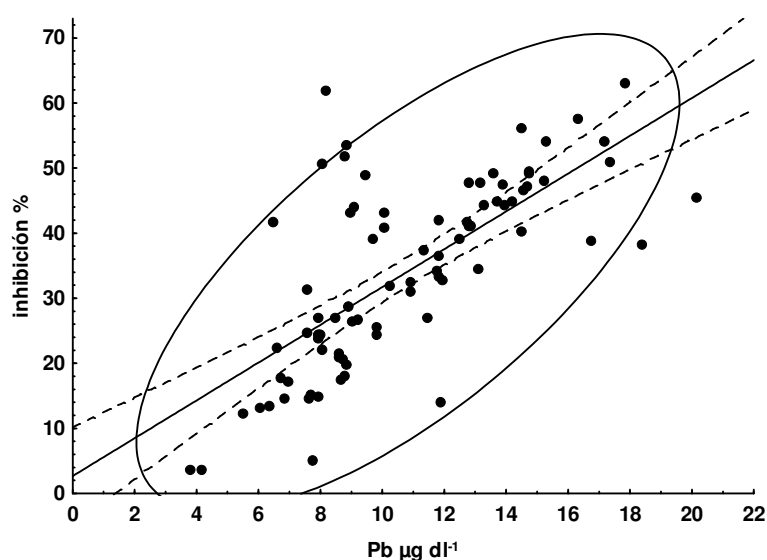


Fig. 48. Relación entre el nivel de Pb sanguíneo y el %I en *P. lineatus* [%I = 2,66 + 2,91 x Pb;  $r^2 = 0,49$ ;  $r = 0,70$ ;  $p = 0,00001$ ]. Las bandas de confianza, al nivel 95% están representadas por líneas punteadas; y los intervalos de confianza por la elipse.

#### IV. 3. Efectos del plomo sobre la actividad de ALA-D

Para determinar el NOEL y la  $CI_{50}$  se analizó la relación entre el cociente  $ALA-D_R/ALA-D$  y el nivel de plomo en sangre, para la cual se registró un coeficiente de correlación significativo y positivo ( $r = 0,61$ ;  $p < 0,05$ ). La línea de regresión que mostró un mejor ajuste fue lineal ( $r^2 = 0,38$ ). En la Fig. 49 se presenta dicha línea.

La ecuación calculada por cuadrados mínimos fue:

$$\frac{ALA - DR}{ALA - D} = 0,9235 + 0,0617 \times [Pb]$$

A partir de esta ecuación se estimó el NOEL y la  $CE_{50}$  tal como se explicó en el Capítulo III. El valor de NOEL obtenido fue igual a  $1,24 \mu\text{g Pb dl}^{-1}$  y la  $CI_{50}$  resultó  $17,45 \mu\text{g Pb dl}^{-1}$ .

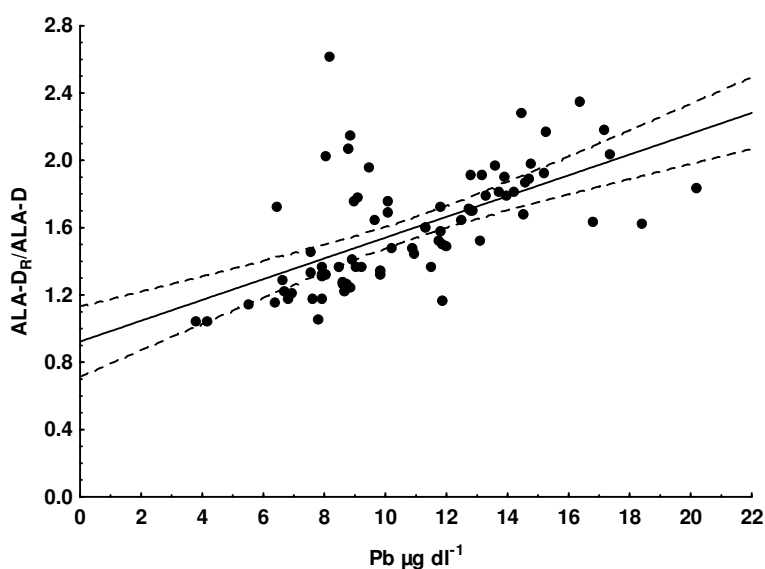


Fig. 49. Relación entre el cociente  $ALA-D_R/ALA-D$  y el nivel de Pb en sangre de *P. lineatus* de Berazategui [ $r = 0,61$ ;  $p = 0,0000$ ;  $r^2 = 0,38$ ]. Las bandas de confianza, al nivel 95% están representadas por líneas punteadas.

#### IV. 4. Parámetros hematológicos

En la tabla 19 se presentan el contenido de hemoglobina (Hb) y el hematocrito (Hct) de *P. lineatus* provenientes de Berazategui. Los datos se presentan discriminados por muestreo y por sexo.

En primera instancia se analizaron las diferencias entre sexos, para cada muestreo. El nivel de hemoglobina y el hematocrito no presentaron diferencias significativas entre sexos ( $p > 0,05$ ). Por esto se pudo calcular un nivel promedio total para cada muestreo.

Luego se evaluaron las diferencias entre los distintos muestreos trabajando con los promedios totales de cada muestreo. Ambos parámetros presentaron diferencias significativas entre los muestreos ( $p < 0,05$ ).

El contenido de hemoglobina presentó los menores niveles en octubre de 2002 y febrero de 2003 y 2004; mientras que los mayores se registraron en diciembre de 2003 y mayo de 2004 ( $p < 0,05$ ). Con respecto al hematocrito los menores valores correspondieron a julio de 2002 y los mayores a diciembre de 2002 y 2003 ( $p < 0,05$ ).

Tabla 19. Contenido de hemoglobina y hematocrito ( $x \pm DE$ ) de *P. lineatus* de Berazategui.

<b>Muestreo</b>		<b>n</b>	<b>Hb (g dl<sup>-1</sup>)</b>	<b>Hct (%)</b>
<b>Jun-02</b>	H	4	8,9 ± 2,3	41 ± 10
	M	3	9,1 ± 2,4	41 ± 11
	AS	7	9,0 ± 2,3 <sup>ab</sup>	41 ± 10 <sup>abc</sup>
<b>Jul-02</b>	H	4	7,6 ± 1,0	31 ± 5
	M	3	9,0 ± 2,3	38 ± 6
	AS	7	8,1 ± 1,5 <sup>ab</sup>	32 ± 5 <sup>a</sup>
<b>Oct-02</b>	H	6	7,2 ± 1,6	36 ± 9
	M	3	5,0 ± 2,4	39 ± 5
	AS	9	6,6 ± 1,9 <sup>a</sup>	36 ± 8 <sup>ab</sup>
<b>Dic-02</b>	H	4	9,5 ± 0,7	49 ± 3
	M	5	8,6 ± 2,8	51 ± 8
	AS	9	9,0 ± 2,1 <sup>ab</sup>	50 ± 6 <sup>c</sup>
<b>Feb-03</b>	H	5	6,5 ± 1,2	40 ± 3
	M	3	7,0 ± 0,4	39 ± 3
	AS	8	7,0 ± 1,2 <sup>a</sup>	40 ± 3 <sup>ab</sup>
<b>Abr-03</b>	H	7	9,2 ± 1,9	46 ± 6
	M	3	7,9 ± 1,7	46 ± 10
	AS	10	8,8 ± 1,8 <sup>ab</sup>	46 ± 7 <sup>bc</sup>
<b>Jun-03</b>	H	5	9,0 ± 2,7	36 ± 7
	M	3	9,1 ± 1,3	46 ± 7
	AS	8	9,0 ± 2,2 <sup>ab</sup>	37 ± 6 <sup>ab</sup>
<b>Sep-03</b>	H	4	8,0 ± 1,4	38 ± 8
	M	3	8,1 ± 2,3	35 ± 7
	AS	7	8,0 ± 1,7 <sup>ab</sup>	37 ± 7 <sup>ab</sup>
<b>Dic-03</b>	H	4	10,0 ± 1,0	53 ± 4
	M	3	10,5 ± 0,4	56 ± 4
	AS	7	10,1 ± 0,9 <sup>b</sup>	54 ± 3 <sup>c</sup>
<b>Feb-04</b>	H	4	6,7 ± 3,1	31 ± 12
	M	3	5,9 ± 0,9	29 ± 8
	AS	7	6,5 ± 2,5 <sup>a</sup>	30 ± 10 <sup>ab</sup>
<b>May-04</b>	H	4	11,3 ± 2,3	46 ± 13
	M	4	11,0 ± 1,9	53 ± 16
	AS	8	11,2 ± 2,0 <sup>b</sup>	51 ± 14 <sup>abc</sup>

n = número de individuos; H = hembras; M = machos; AS = ambos sexos. Letras distintas corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### IV. 4. 1. Parámetros hematológicos y su relación con la actividad de ALA-D y el nivel de plomo

En la Tabla 20 se presentan los coeficientes de correlación de Pearson para los parámetros hematológicos con la actividad de la enzima ALA-D y los niveles de plomo; los cuales no resultaron significativos en ningún caso ( $p > 0,05$ ).

Tabla 20. Coeficientes de correlación de Pearson

		<i>Hb</i>	<i>Hct</i>
<b>Sangre</b>	<b>ALA-D</b>	-0,08	-0,03
	<b>%I</b>	-0,03	-0,22
	<b>Pb</b>	0,04	-0,12
<b>Hígado</b>	<b>ALA-D</b>	-0,19	-0,20
	<b>Pb</b>	-0,10	-0,03
<b>Branquias</b>	<b>Pb</b>	0,01	0,04

Estos resultados mostraron que tanto el contenido de hemoglobina como el hematocrito no dependen de la actividad de la enzima ALA-D como así tampoco de los niveles de plomo registrados en los distintos tejidos.

#### IV. 5. Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo mostraron que:

a) La actividad enzimática determinada en los peces en condiciones naturales resultó significativamente menor que la reactivada con  $Zn^{+2}$ . Por lo tanto se consideró que la enzima se encontraba inhibida y se calculó el porcentaje de inhibición.

b) El porcentaje de inhibición presentó una mejor correlación con el nivel de plomo sanguíneo ( $r = 0,70$ ) que la registrada entre la actividad de la enzima y el nivel de plomo ( $r = 0,38$ ).

Estos resultados demostraron que mediante la reactivación de la enzima ALA-D en sangre obtenemos un valor de actividad máximo y así el mismo individuo constituye el control de referencia. Esto adquiere gran importancia en estudios de campo ya que de esta forma se reduce la variabilidad intraespecífica de la actividad

enzimática y por otro lado se elimina la necesidad de muestrear en una zona de referencia.

c) El valor de NOEL coincidió con el registrado en los estudios de laboratorio, mientras que la  $Cl_{50}$  resultó aproximadamente la mitad ( $17,45 \mu\text{g Pb dl}^{-1}$ ). Un mayor valor de  $Cl_{50}$  en condiciones de laboratorio podría deberse a que de la totalidad del plomo determinado en sangre sólo una proporción está inhibiendo al ALA-D mientras que posiblemente se encuentra unida a otros elementos de la sangre, como por ejemplo la membrana de los eritrocitos. Varios estudios realizados en humanos demostraron una capacidad limitada del ALA-D para unir plomo, sobrepasada la cual el metal se une a otros componentes de la sangre (Schütz y Skerfving, 1976; Sakai et al., 1982; Bergdahl et al., 1997).

En humanos el valor de NOEL,  $1,5 \mu\text{g dl}^{-1}$ , es similar al registrado para *P. lineatus*; mientras que la  $Cl_{50}$  es de sólo  $2,5 \mu\text{g dl}^{-1}$  (Granick et al., 1973), casi diez veces menor que la de peces. La misma diferencia se observó en estudios *in vitro* con el ALA-D hepática de peces, en la cual la  $Cl_{50}$  resultó de  $17,3 \mu\text{g Pb dl}^{-1}$ , unas 40 veces mayor que la registrada para hígado de rata (Conner y Fowler, 1994). Estos resultados demuestran que existen claras diferencias en cuanto a la sensibilidad a plomo entre la enzima de peces y mamíferos, siendo esta última mucho más sensible a este metal.

Por último se evaluó si los parámetros hematológicos se encontraban afectados por la exposición a plomo. Ninguno de los parámetros hematológicos mostró una relación con la actividad del ALA-D, con el porcentaje de inhibición ni con los niveles de plomo en los distintos tejidos. Este hecho indica que la reacción catalizada por el ALA-D no es un paso limitante en la síntesis de hemo en peces. En estudios de campo, otros autores que han documentado inhibición de ALA-D en peces han resultado inconsistentes en cuanto a los efectos del plomo sobre la hemoglobina. Schmitt et al., (1984, 1993, 2001, 2005) estudiaron diversos catostómidos de zonas cercanas a minas los cuales presentaron una inhibición de ALA-D de 50-60%, mientras que no mostraron cambios en el contenido de hemoglobina con respecto a los peces del sitio de referencia. En cambio, Haux et al. (1986) reportaron niveles menores y mayores de hemoglobina en peces de lagos contaminados con plomo con respecto a los del sitio de referencia. En aves, diversos estudios de campo han encontrado una correlación negativa significativa entre el

contenido de hemoglobina y la concentración de plomo en sangre (Blus et al., 1991, 1993, 1995, 1999; Henny et al., 1994).

## V. Actividad de la enzima ALA-D en *P. lineatus* recolectados de distintas zonas

Para corroborar el uso del %I como parámetro biomarcador se prosiguió con los estudios de monitoreo en las zonas anteriormente nombradas, Berisso y Atalaya donde se realizaron muestreos anuales. También se registraron datos de la ciudad de Corrientes correspondientes a un solo muestreo. En este capítulo se presentan los niveles de actividad de la enzima ALA-D en muestras de sangre y tejido hepático de *P. lineatus* provenientes de dichas zonas.

Básicamente se realizó el mismo tipo de análisis que para las muestras de *P. lineatus* provenientes de Berazategui a excepción de los peces provenientes de Corrientes, ya que el número de individuos recolectados en esta zona resultaba insuficiente para este tipo de análisis.

Finalmente se efectuó un análisis comparativo entre las diferentes zonas estudiadas.

### V. 1. Niveles de actividad de la enzima ALA-D y su relación con el sexo, edad y peso corporal de los peces

#### V. 1. 1. 1. Sangre

En la tabla 21 se presentan los valores correspondientes a la actividad de ALA-D, ALA-D<sub>R</sub> y el %I en *P. lineatus* recolectados en la zona de Berisso.

En primer lugar, se estudiaron las posibles diferencias entre sexos para cada muestreo. Posteriormente se analizaron las diferencias entre los distintos muestreos para cada una de las variables estudiadas.

Las actividades de ALA-D y de ALA-D<sub>R</sub> de *P. lineatus* provenientes de Berisso no presentaron diferencias significativas entre sexos ( $p > 0,05$ ). Estos resultados permitieron calcular un valor promedio para cada muestreo y para cada una de las variables estudiadas. Estos promedios posteriormente fueron utilizados para analizar las diferencias entre muestreos.

Los niveles promedio de ALA-D de *P. lineatus* de Berisso presentaron menores valores en abril de 2003 y mayores en octubre de 2002 ( $p < 0,05$ ). En

cambio los valores de ALA-D<sub>R</sub> no presentaron diferencias significativas entre los distintos muestreos ( $p > 0,05$ ).

Tabla 21. Actividad de la enzima ALA-D ( $x \pm DE$ ) de *P. lineatus* de Berisso.

<b>Muestreo</b>		<b>N</b>	<b>ALA-D (U ml GR<sup>-1</sup>)</b>	<b>ALA-D<sub>R</sub> (U ml GR<sup>-1</sup>)</b>	<b>%I</b>
<b>Oct-02</b>	H	3	798 ± 212	1017 ± 238	22 ± 6
	M	6	648 ± 179	952 ± 229	33 ± 4
	<b>AS</b>	<b>9</b>	<b>698 ± 192<sup>a</sup></b>	<b>974 ± 219<sup>c</sup></b>	<b>29 ± 7<sup>d</sup></b>
<b>Abr-03</b>	H	7	477 ± 84	872 ± 172	45 ± 5
	M	4	485 ± 38	974 ± 59	50 ± 4
	<b>AS</b>	<b>11</b>	<b>480 ± 69<sup>b</sup></b>	<b>909 ± 146<sup>c</sup></b>	<b>47 ± 5<sup>e</sup></b>
<b>Nov-03</b>	H	8	651 ± 271	826 ± 255	20 ± 21
	M	3	492 ± 124	876 ± 58	44 ± 15
	<b>AS</b>	<b>11</b>	<b>608 ± 245<sup>a,b</sup></b>	<b>840 ± 216<sup>c</sup></b>	<b>27 ± 21<sup>d</sup></b>

n = número de individuos; H = hembras; M = machos; AS = ambos sexos. Letras distintas corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Paralelamente se analizaron las diferencias entre la actividad de ALA-D y ALA-D<sub>R</sub> para cada muestreo; registrándose diferencias significativas entre ellas ( $p < 0,05$ ). En base a estos resultados se consideró que la actividad de la enzima ALA-D se encontraba inhibida y se procedió a calcular el %I.

Al igual que la actividad de ALA-D, los %I, presentaron diferencias significativas entre muestreos ( $p < 0,05$ ), observándose la máxima inhibición en abril de 2003.

Por último se analizaron las relaciones entre los niveles de actividad de la enzima y la edad y peso de los peces. La actividad del ALA-D no presentó correlaciones significativas ni con la edad ni con el peso corporal ( $p > 0,05$ ). La longitud total y el peso corporal presentaron un coeficiente de correlación positivo significativo ( $r = 0,94$ ;  $p < 0,05$ ).

En la tabla 22 se presentan los valores correspondientes a la actividad de ALA-D y ALA-D<sub>R</sub> en *P. lineatus* provenientes de Atalaya.

Los niveles de actividad de ALA-D y ALA-D<sub>R</sub> de la enzima de *P. lineatus* provenientes de Atalaya no presentaron diferencias significativas entre sexos ( $p > 0,05$ ). En consecuencia, fue posible calcular un valor promedio para cada muestreo y para cada una de las variables estudiadas.

Tabla 22. Actividad de la enzima ALA-D ( $\bar{x} \pm DE$ ) de *P. lineatus* de Atalaya.

<b>Muestreo</b>		<b>n</b>	<b>ALA-D (U ml GR<sup>-1</sup>)</b>	<b>ALA-D<sub>R</sub> (U ml GR<sup>-1</sup>)</b>
<b>Nov-02</b>	H	3	1015 ± 156	1150 ± 262
	M	3	861 ± 231	938 ± 173
	<b>AS</b>	<b>6</b>	<b>953 ± 181</b>	<b>1065 ± 235</b>
<b>Oct-03</b>	H	4	1010 ± 97	1233 ± 215
	M	3	1202 ± 512	1314 ± 805
	<b>AS</b>	<b>7</b>	<b>1074 ± 261</b>	<b>1260 ± 279</b>
<b>Abr-04</b>	H	3	987 ± 123	1058 ± 164
	M	5	864 ± 208	972 ± 222
	<b>AS</b>	<b>8</b>	<b>910 ± 182</b>	<b>1005 ± 195</b>

n = número de individuos; H = hembras; M = machos; AS = ambos sexos

No se encontraron diferencias significativas entre los distintos muestreos para la actividad de ALA-D ( $p > 0,05$ ). En cuanto a la enzima reactivada tampoco se encontraron diferencias significativas entre los distintos muestreos ( $p > 0,05$ ).

Dado que no se observaron diferencias significativas entre la actividad del ALA-D y ALA-D<sub>R</sub> ( $P > 0,05$ ), no fue posible calcular el %I.

El análisis de correlación entre la actividad del ALA-D y la longitud y peso de los peces no mostró coeficientes significativos ( $p > 0,05$ ), registrándose valores de 0,27 y 0,28 respectivamente. Por otro lado, la longitud total y el peso corporal presentaron un coeficiente de correlación positivo y significativo ( $r = 0,80$ ;  $p < 0,05$ ).

En la Tabla 23 se muestran los niveles de actividad del ALA-D y ALA-D<sub>R</sub> de *P. lineatus* provenientes de Corrientes. No se observaron diferencias significativas entre la actividad no reactivada y reactivada de la enzima ( $p > 0,05$ ); por lo tanto tampoco se calculó el %I.

Tabla 23. Actividad de la enzima ALA-D ( $\bar{x} \pm DE$ ) de *P. lineatus* de Corrientes.

<b>Muestreo</b>	<b>n</b>	<b>ALA-D (U ml GR<sup>-1</sup>)</b>	<b>ALA-D<sub>R</sub> (U ml GR<sup>-1</sup>)</b>
<b>Dic-03</b>	5	1229 ± 318	1373 ± 328

Los valores corresponden a ambos sexos.

### V. 1. 1. 2. Variación en los niveles de actividad de ALA-D, ALA-DR y %I, entre zonas

En la Fig. 50 se muestran las actividades de ALA-D y ALA-D<sub>R</sub> de la enzima en *P. lineatus* de distintas zonas de los ríos de la Plata y Paraná. Si bien estos resultados ya han sido presentados anteriormente, se los muestra aquí a fin de una mejor visualización para la comparación de los datos.

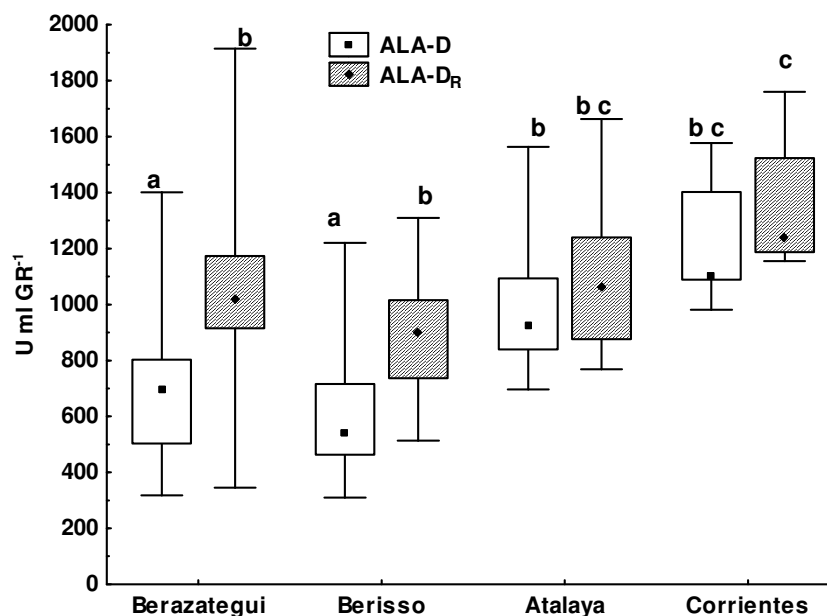


Fig. 50. Actividad no reactivada (ALA-D) y reactivada (ALA-D<sub>R</sub>) de la enzima ALA-D en sangre de *P. lineatus* de distintas zonas de los ríos de la Plata y Paraná. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Los peces de Berazategui y Berisso presentaron diferencias significativas entre la actividad de ALA-D y ALA-D<sub>R</sub> ( $p < 0,05$ ).

Con respecto a la actividad de ALA-D los mayores niveles se registraron en los ejemplares provenientes de Atalaya y Corrientes y las menores en los de Berisso y Berazategui ( $p < 0,05$ ).

En cuanto a la actividad de ALA-D<sub>R</sub> se encontraron diferencias significativas entre los peces provenientes de Berazategui y Berisso con los de Corrientes ( $p < 0,05$ ).

### V. 1. 2. 1. Tejido hepático

En las tablas 24 y 25 se presentan los valores correspondientes a la actividad específica de la enzima ALA-D en muestras de tejido hepático de *P. lineatus* provenientes de Berisso y Atalaya, respectivamente.

Al igual que con la actividad en muestras de sangre, primero se evaluaron las diferencias entre sexos para cada muestreo, y luego se analizaron las diferencias entre los distintos muestreos.

La actividad específica en muestras de tejido hepático de *P. lineatus* de Berisso no presentó diferencias significativas entre sexos ( $p > 0,05$ ). Por esto se pudo calcular un valor de actividad promedio para cada muestreo.

Tabla 24. Actividad específica de la enzima ALA-D ( $\bar{x} \pm DE$ ) en tejido hepático de *P. lineatus* de Berisso

<b>Muestreo</b>	<b>n</b>	<b>Hembras</b> <b>U (mg proteína)<sup>-1</sup></b>	<b>n</b>	<b>Machos</b> <b>U (mg proteína)<sup>-1</sup></b>	<b>n</b>	<b>Ambos sexos</b> <b>U (mg proteína)<sup>-1</sup></b>
<b>Oct-02</b>	3	3,3 ± 0,5	6	3,4 ± 0,8	9	3,4 ± 0,7
<b>Abr-03</b>	7	3,2 ± 1,1	4	4,2 ± 0,4	11	3,6 ± 1,0
<b>Nov-03</b>	8	3,1 ± 0,6	3	3,1 ± 0,6	11	3,1 ± 0,6
<b>Total</b>	18	3,2 ± 0,8	13	3,5 ± 0,7	31	3,3 ± 0,8

n = número de individuos

La actividad específica promedio no mostró diferencias significativas entre los distintos muestreos ( $p > 0,05$ ). Estos resultados permitieron calcular un valor promedio de actividad específica para *P. lineatus* de Berisso.

Posteriormente se analizaron las relaciones entre la actividad de la enzima y la edad y peso corporal de los peces, en ninguno de los dos casos se registraron coeficientes de correlación significativos ( $p > 0,05$ ).

La actividad específica de la enzima ALA-D en *P. lineatus* de Atalaya no presentó diferencias significativas entre sexos ( $p > 0,05$ ). Por consiguiente fue posible calcular un valor promedio total para cada muestreo. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los muestreos ( $p > 0,05$ ). Esto permitió calcular un nivel de actividad específica promedio total para *P. lineatus* de Atalaya.

Con respecto a *P. lineatus* de Corrientes, la actividad específica promedio registrada en muestras de tejido hepático fue de  $3,6 \pm 1,1$  U (mg. prot)<sup>-1</sup>.

Tabla 25. Actividad específica de la enzima ALA-D ( $x \pm DE$ ) en tejido hepático de *P. lineatus* de Atalaya

Muestreo	n	Hembras U mg proteína <sup>-1</sup>	n	Machos U mg proteína <sup>-1</sup>	n	Ambos sexos U mg proteína <sup>-1</sup>
<b>Nov-02</b>	3	3,0 ± 0,2	3	2,8 ± 0,6	6	2,9 ± 0,3
<b>Oct-03</b>	4	3,0 ± 0,3	3	3,1 ± 0,4	7	3,0 ± 0,3
<b>Abr-04</b>	3	3,5 ± 0,1	5	3,1 ± 0,6	8	3,2 ± 0,5
Total	10	3,1 ± 0,3	11	3,0 ± 0,5	21	3,1 ± 0,4

n = número de individuos

### V. 1. 2. 2. Variación en los niveles de actividad específica de la enzima ALA-D entre zonas

Como se observó en el capítulo II y en este capítulo, la actividad específica de la enzima ALA-D determinada en muestras de tejido hepático de *P. lineatus* no presentó diferencias ni entre sexos, ni entre muestreos en ninguna de las zonas del río de la Plata estudiadas. Esto permitió realizar un análisis de las posibles diferencias en la actividad de la enzima ALA-D entre las distintas zonas de los ríos de la Plata (Berazategui, Berisso y Atalaya) y Paraná (Corrientes), para lo cual se trabajó con los promedios totales de cada zona.

En la Fig. 51 se muestran las actividades específicas de la enzima ALA-D en *P. lineatus* de distintas zonas de los ríos de la Plata y Paraná. Estos resultados ya han sido presentados anteriormente, pero se muestran aquí a fin de una mejor visualización para la comparación de los datos.

A diferencia de lo observado en sangre, la actividad específica de la enzima ALA-D en tejido hepático no presentó diferencias significativas entre las distintas zonas estudiadas ( $p > 0,05$ ).

## V. 2. Índices morfométricos

En las tablas 26 y 27 se presentan el factor de condición (FC) y el índice hepato-somático (IHS) de *P. lineatus* provenientes de Berisso y Atalaya, respectivamente. Los datos están agrupados por muestreo y discriminados por sexo.

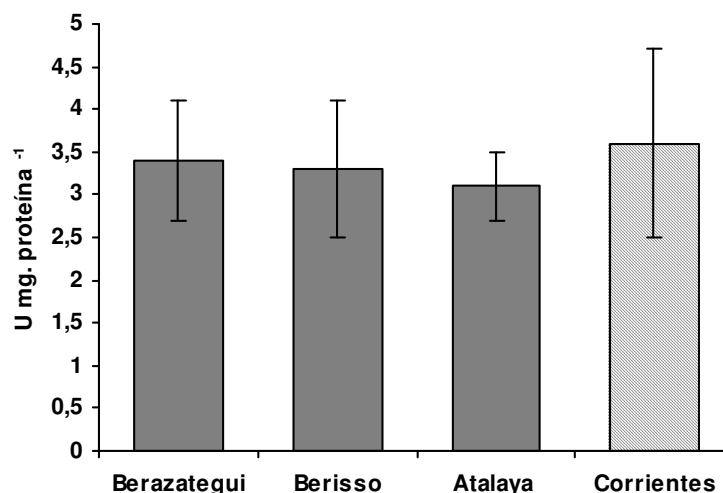


Fig. 51. Actividad específica de la enzima ALA-D en tejido hepático ( $x \pm DE$ ) de *P. lineatus* de distintas zonas de los ríos de la Plata (barras rellenas) y Paraná (barra rallada).

Tabla 26. FC e IHS ( $x \pm DE$ ) de *P. lineatus* de Berisso.

Muestreo		n	FC	IHS
<b>Oct-02</b>	H	3	2,5 ± 0,1	1,2 ± 0,9
	M	6	2,7 ± 0,7	1,6 ± 0,4
	AS	9	2,6 ± 0,6	1,5 ± 0,6
<b>Abr-03</b>	H	7	2,6 ± 0,4	1,0 ± 0,3
	M	4	2,3 ± 0,2	1,2 ± 0,2
	AS	11	2,5 ± 0,3	1,1 ± 0,2
<b>Nov-03</b>	H	8	2,8 ± 0,3	1,0 ± 0,3
	M	3	2,7 ± 0,6	1,1 ± 0,3
	AS	11	2,8 ± 0,4	1,1 ± 0,3
<b>Total</b>	<b>H</b>	<b>18</b>	<b>2,6 ± 0,3</b>	<b>1,0 ± 0,4</b>
	<b>M</b>	<b>13</b>	<b>2,6 ± 0,5</b>	<b>1,3 ± 0,4</b>
	<b>AS</b>	<b>31</b>	<b>2,6 ± 0,4</b>	<b>1,1 ± 0,4</b>

n = número de individuos; H = hembras; M = machos; AS = ambos sexos

Los índices morfométricos de *P. lineatus* de Berisso no presentaron diferencias significativas entre sexos ( $p > 0,05$ ), por lo cual se pudo calcular un valor promedio para cada muestreo y cada índice.

El FC promedio de *P. lineatus* de Berisso no presentó diferencias significativas entre muestreos ( $p > 0,05$ ). El mismo resultado se obtuvo para el IHS ( $p > 0,05$ ). En cada caso se calcularon valores promedio.

Tabla 27. FC e IHS ( $\bar{x} \pm DE$ ) de *P. lineatus* de Atalaya.

<b>Muestreo</b>		<b>n</b>	<b>FC</b>	<b>IHS</b>
<b>Nov-02</b>	H	3	2,7 ± 0,3	0,5 ± 0,3
	M	3	2,3 ± 0,7	0,4 ± 0,1
	<b>AS</b>	6	2,5 ± 0,4	<b>0,5 ± 0,2<sup>a</sup></b>
<b>Oct-03</b>	H	4	2,3 ± 0,5	1,5 ± 0,4
	M	3	1,9 ± 0,6	1,5 ± 0,7
	<b>AS</b>	7	2,2 ± 0,5	<b>1,5 ± 0,4<sup>b</sup></b>
<b>Abr-04</b>	H	3	2,4 ± 0,3	0,4 ± 0,1
	M	5	2,5 ± 0,5	0,6 ± 0,1
	<b>AS</b>	8	2,5 ± 0,5	<b>0,5 ± 0,1<sup>a</sup></b>
<b>Total</b>	<b>H</b>	<b>10</b>	<b>2,5 ± 0,4</b>	
	<b>M</b>	<b>11</b>	<b>2,0 ± 0,9</b>	
	<b>AS</b>	<b>21</b>	<b>2,4 ± 0,5</b>	

n = número de individuos; H = hembras; M = machos; AS = ambos sexos. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Con respecto a *P. lineatus* de Atalaya, tanto el FC como el IHS no presentaron diferencias significativas entre sexos ( $p > 0,05$ ). Estos resultados posibilitaron calcular un promedio total de cada parámetro para cada muestreo.

Tampoco se observaron diferencias significativas entre los muestreos para el IC ( $p > 0,05$ ). Por lo tanto se calculó un valor promedio total. Por el contrario el IHS registrado en octubre de 2003 resultó significativamente mayor al resto de los muestreos ( $p < 0,05$ ).

Para *P. lineatus* de Corrientes, el FC promedio fue de  $2,2 \pm 0,1$ , con un rango de variación de 2,2 - 2,3; y el IHS promedio fue de  $0,6 \pm 0,1$  con un rango de variación de 0,6 - 0,7.

### V. 2. 1. Variación de los índices morfométricos entre zonas

En la figura 52 se presenta el factor de condición (FC) para cada zona de muestreo. El FC promedio más elevado se registró en Berazategui, mientras que el menor en Corrientes ( $p < 0,05$ ).

En la Fig. 53 se presenta el índice hepato-somático (IHS) de *P. lineatus* correspondiente a las distintas zonas de muestreo. Para los peces de Berazategui y

Berisso se registraron los mayores IHS, mientras que los menores valores correspondieron a los de Corrientes ( $p < 0,05$ ).

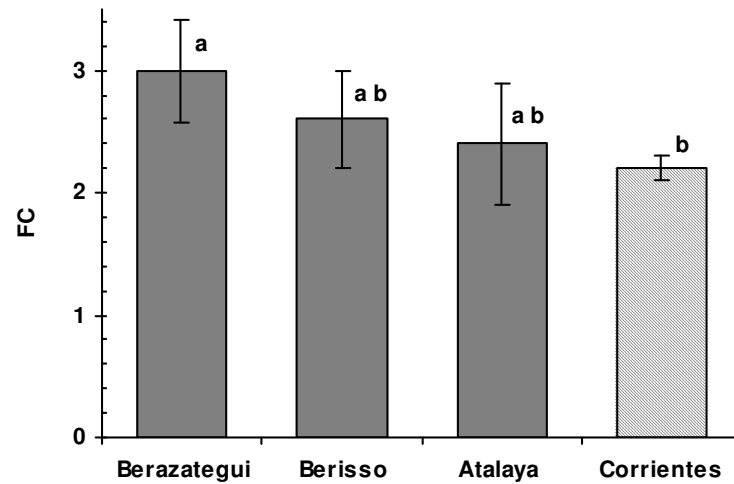


Fig. 52. FC ( $x \pm DE$ ) de *P. lineatus* de distintas zonas de los ríos de la Plata (barras rellenas) y Paraná (barra rallada). Letras distintas corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

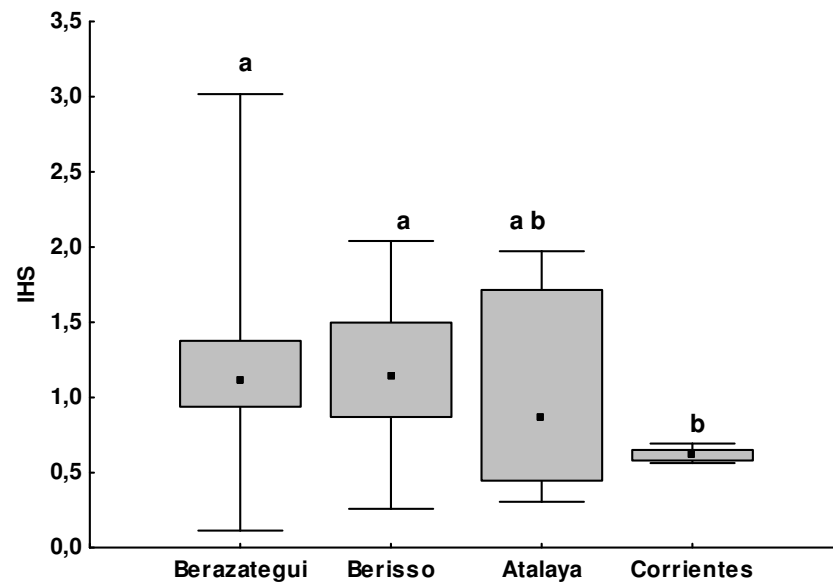


Fig. 53. IHS ( $x \pm DE$ ) de *P. lineatus* de distintas zonas de los ríos de la Plata y Paraná. Letras distintas corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### V. 3. Niveles de plomo en muestras de sangre, tejido hepático y branquias de *P. lineatus*

Previamente a la realización de los diagramas de bloque se estudiaron los niveles de ambos metales en relación al sexo de los peces. No se encontraron diferencias entre sexos en los niveles de plomo en ninguno de los tejidos estudiados ( $p > 0,05$ ). Por consiguiente se trabajó con la totalidad de los datos, sin discriminar entre sexos.

En la Fig. 54 se muestran los niveles de plomo en muestras de sangre de *P. lineatus* provenientes de Berisso. Los niveles de plomo registrados en muestras de sangre presentaron las mayores concentraciones durante abril de 2003 ( $p < 0,05$ ).

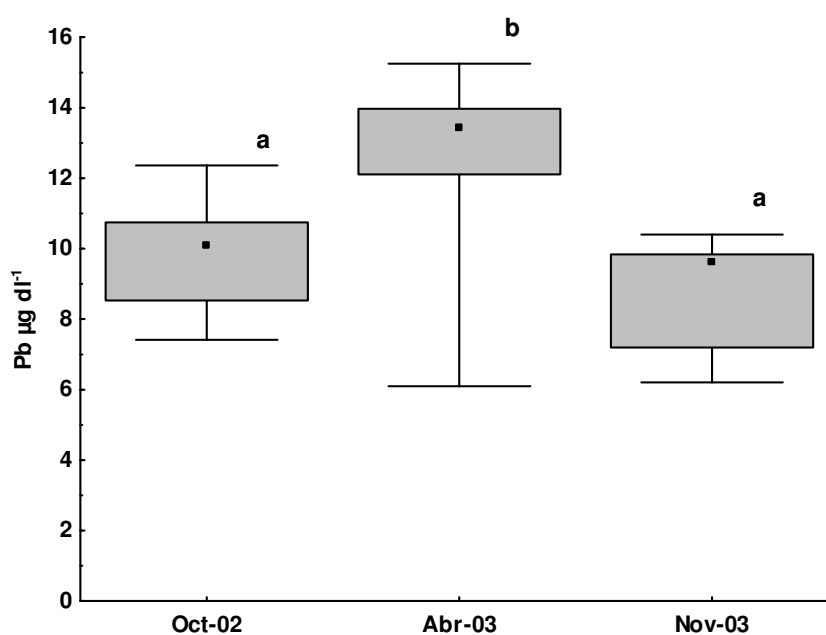


Fig. 54. Niveles de Pb en  $\mu\text{g dl}^{-1}$  en muestras de sangre de *P. lineatus* de Berisso.

En la Fig. 55 se presentan los niveles de plomo en muestras de tejido hepático y branquias de *P. lineatus* recolectados en Berisso. En estos tejidos no se observaron diferencias significativas en los niveles de plomo entre los distintos muestreos, ni entre tejidos ( $p > 0,05$ ).

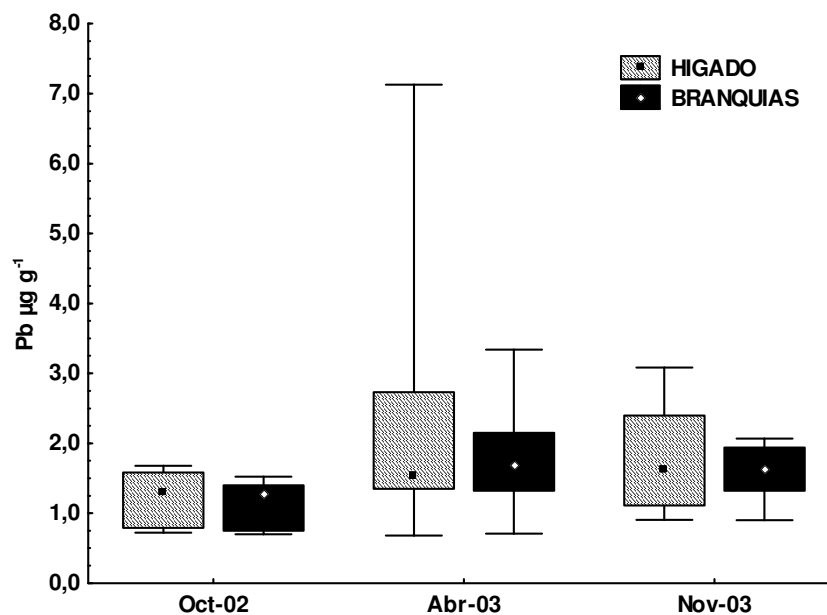


Fig. 55. Niveles de Pb en  $\mu\text{g g}^{-1}$  en muestras de hígado y branquias de *P. lineatus* de Berisso.

En la Fig. 56 se presentan los niveles de plomo en muestras de sangre de *P. lineatus* provenientes de Atalaya. No se observaron diferencias significativas entre los muestreos ( $p > 0,05$ ).

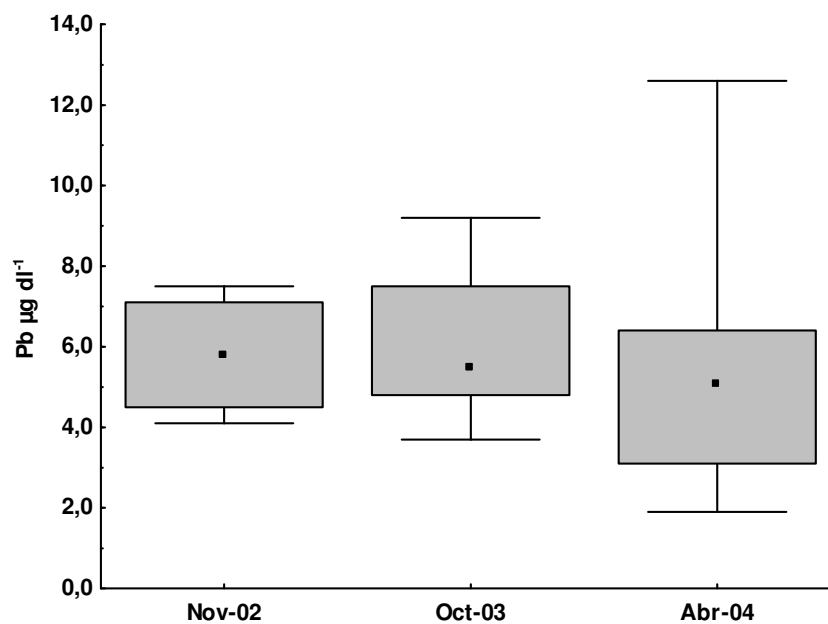


Fig. 56. Niveles de Pb en  $\mu\text{g dl}^{-1}$  en muestras de sangre de *P. lineatus* de Atalaya.

En la Fig. 57 se muestran los niveles de plomo registrados en muestras de tejido hepático y branquias. Tanto en tejido hepático como en branquias, se registró un aumento progresivo de los niveles de plomo a lo largo de los distintos muestreos ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, para cada muestreo, los niveles de plomo determinados en branquia resultaron más elevados que los registrados en hígado ( $p < 0,05$ ).

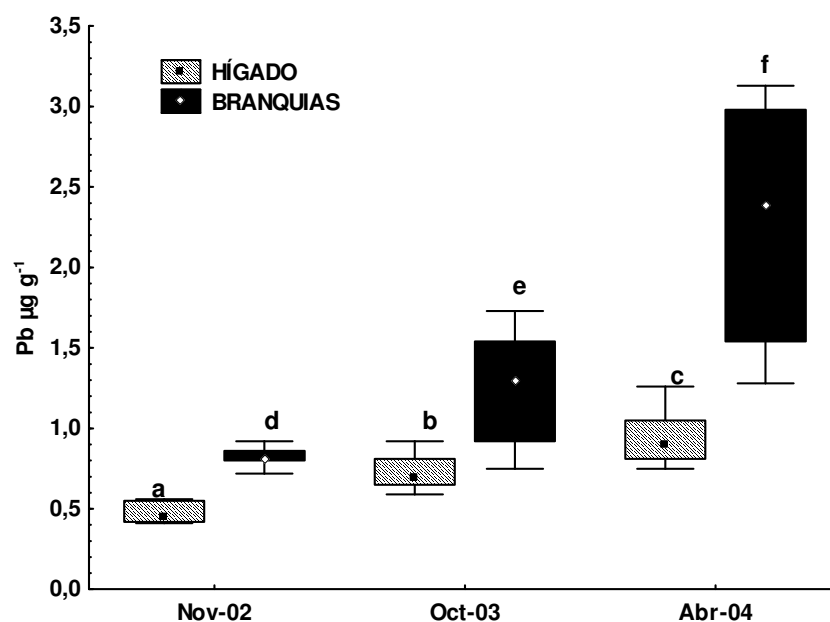


Fig. 57. Niveles de Pb en  $\mu\text{g g}^{-1}$  en muestras de hígado y branquias de *P. lineatus* de Atalaya. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Los niveles de plomo determinados en sangre de *P. lineatus* de Corrientes, presentaron un rango de variación de  $< 0,1 \mu\text{g dl}^{-1}$  a  $4,4 \mu\text{g dl}^{-1}$ . El rango de variación del nivel de plomo en tejido hepático fue de  $0,47$  a  $0,68 \mu\text{g g}^{-1}$ ; y el de branquia fue de  $0,90$  a  $0,97 \mu\text{g g}^{-1}$ .

#### V. 4. Relaciones entre la actividad del ALA-D y los niveles de plomo

En la tabla 28 se presentan los coeficientes de correlación para los niveles de plomo en los distintos tejidos y la actividad de la enzima ALA-D en sangre e hígado y el %I de *P. lineatus* de Berisso.

El nivel de plomo sanguíneo presentó un coeficiente de correlación significativo negativo con la actividad de ALA-D en sangre ( $p < 0,01$ ) y positivo con el %I ( $p < 0,01$ ) y con la actividad de ALA-D hepática ( $p < 0,05$ ).

Tabla 28. Coeficientes de correlación de Pearson entre los niveles de plomo y la actividad de ALA-D en *P. lineatus* de Berisso

<b>Plomo</b>	<b>ALA-D sanguínea</b>	<b>%I</b>	<b>ALA-D hepática</b>
<b>Sangre</b>	<b>-0,48**</b>	<b>0,56**</b>	<b>0,40*</b>
<b>Hígado</b>	-0,25	0,23	0,15
<b>Branquias</b>	-0,19	0,10	-0,07

En negrita correlación significativa \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ )

En la Fig. 58 se presenta la curva de regresión de la actividad de la enzima ALA-D sanguínea en función del  $\log_{10}$  de la concentración de plomo en muestras de sangre.

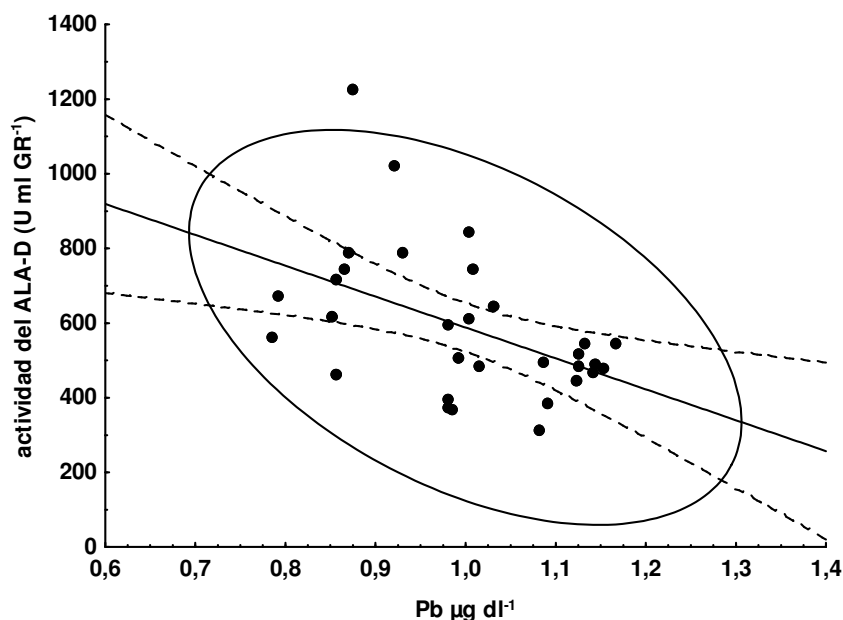


Fig. 58. Relación entre la actividad del ALA-D ( $\text{U mL GR}^{-1}$ ) en sangre y el  $\log_{10}$  de los niveles de Pb en sangre ( $\mu\text{g dl}^{-1}$ ) en *P. lineatus* de Berisso [ $\text{ALA-D} = 1415,91 - 827,74 \times \text{Log}_{10} \text{Pb}$ ;  $r^2 = 0,23$ ;  $p = 0,0063$ ]. Las bandas de confianza al nivel 95%, están representadas por líneas punteadas y los intervalos de confianza por la elipse.

En la Fig. 59 se presenta la curva de regresión de la actividad del ALA-D en función del %I.

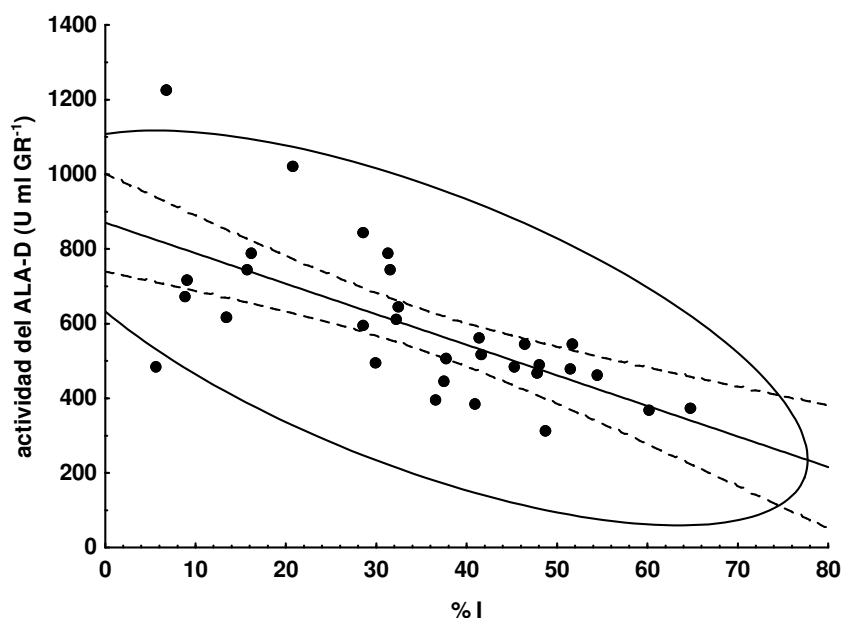


Fig. 59. Relación entre la actividad de ALA-D ( $\text{U mL GR}^{-1}$ ) y %I en *P. lineatus* de Berisso [ALA-D =  $870,59 - 8,18 \times \%I$ ;  $r^2 = 0,45$ ;  $p = 0,00004$ ]. Las bandas de confianza al nivel 95%, están representadas por líneas punteadas y los intervalos de confianza por la elipse.

En la Fig. 60 se muestra la curva de regresión para el %I en función del nivel de plomo sanguíneo.

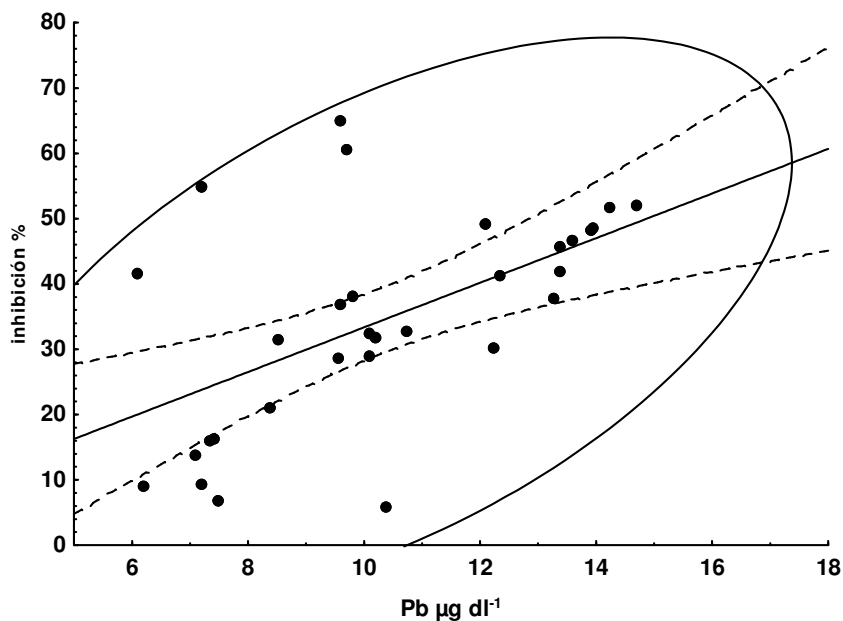


Fig. 60. Relación entre el nivel de Pb sanguíneo y el %I en *P. lineatus* de Berisso [%I =  $-0,80 + 3,42 \times \text{Pb}$ ;  $r^2 = 0,35$ ;  $p = 0,0012$ ]. Las bandas de confianza al nivel 95%, están representadas por líneas punteadas y los intervalos de confianza por la elipse.

En la Fig. 61 se muestra la curva de regresión para la actividad de la enzima ALA-D hepática y el  $\log_{10}$  del nivel de plomo en muestras de sangre

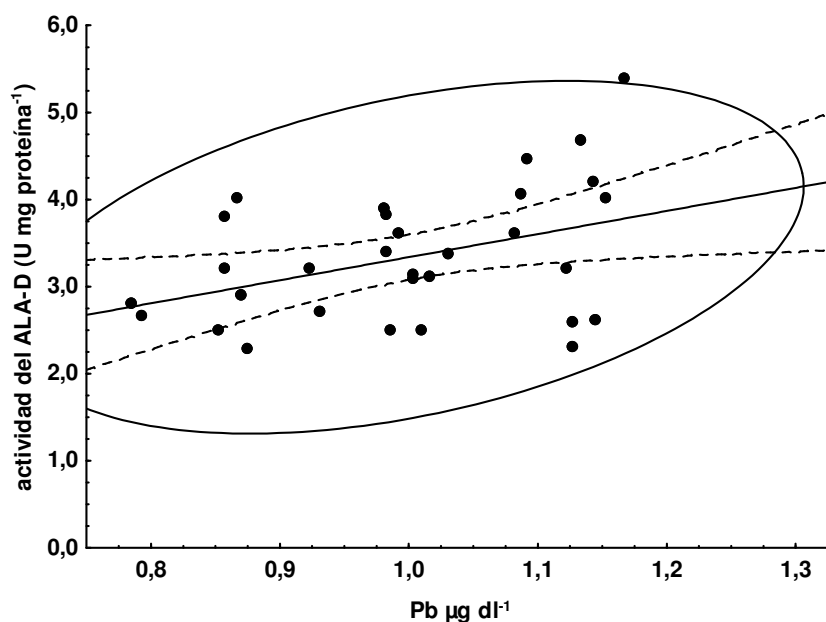


Fig. 61. Relación entre la actividad del ALA-D ( $\text{U mg prot.}^{-1}$ ) en tejido hepático y el  $\log_{10}$  de los niveles de Pb en sangre ( $\mu\text{g dl}^{-1}$ ) en *P. lineatus* de Berisso [ $\text{ALA-D} = 0,69 + 2,65 \times \text{Log}_{10} \text{Pb}$ ;  $r^2 = 0,16$ ;  $p = 0,0253$ ]. Las bandas de confianza, al nivel 95% están representadas por líneas punteadas y los intervalos de confianza por la elipse.

En la tabla 29 se presentan los coeficientes de correlación para los niveles de plomo en los distintos tejidos y la actividad de la enzima ALA-D en sangre e hígado y el %I de *P. lineatus* de Atalaya.

Tabla 29. Coeficientes de correlación de Pearson entre los niveles de plomo y la actividad de ALA-D en *P. lineatus* de Atalaya.

<b>Plomo</b>	<b>ALA-D sanguínea</b>	<b>ALA-D hepática</b>
<b>Sangre</b>	-0,16	0,45
<b>Hígado</b>	-0,27	0,19
<b>Branquias</b>	-0,09	-0,12

Los niveles de plomo en muestras de sangre, hígado y branquias de *P. lineatus* de Atalaya no mostraron una correlación significativa con la actividad de la enzima en ningún tejido ( $p > 0,05$ ).

### V. 5. Efectos del plomo sobre la actividad de ALA-D sanguínea

La determinación del NOEL y la  $CI_{50}$  se analizó solamente en *P. lineatus* provenientes de Berisso, ya que en los peces de Atalaya y Corrientes no se registró inhibición de la actividad de ALA-D. Para ello se analizó la relación entre el cociente  $ALA-D_R/ALA-D$  y el nivel de Pb en sangre, para la cual se registró un coeficiente de correlación significativo y positivo ( $r = 0,44$ ;  $p < 0,05$ ). En la Fig. 62 se presenta la línea de regresión.

La ecuación calculada por mínimos cuadrados fue:

$$\frac{ALA-D_R}{ALA-D} = 0,8907 + 0,0711 \times [Pb]$$

A partir de esta ecuación se estimó el NOEL y la  $CI_{50}$  tal como se explicó en el Capítulo III. El valor de NOEL obtenido fue de  $1,54 \mu\text{g dl}^{-1}$  y la  $CI_{50}$  fue de  $15,60 \mu\text{g dl}^{-1}$ . Ambos valores resultaron similares a los registrados para *P. lineatus* de Berazategui.

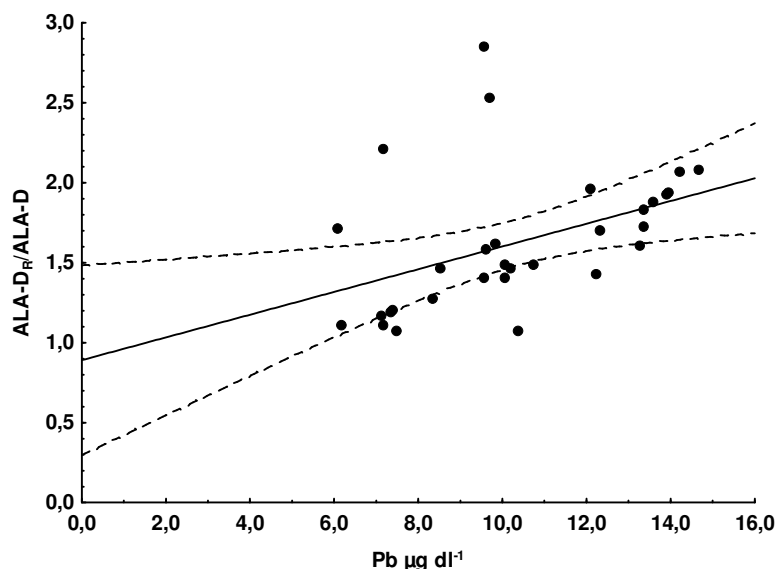


Fig. 62. Relación entre el cociente  $ALA-D_R/ALA-D$  y el nivel de Pb en sangre de *P. lineatus* de Berisso [ $r = 0,44$ ;  $p = 0,0142$ ;  $r^2 = 0,19$ ]. Las bandas de confianza al nivel 95% están representadas por líneas punteadas.

## V. 6. Parámetros hematológicos

En las tablas 30 y 31 se presentan los valores correspondientes a la concentración de hemoglobina (Hb) y al hematocrito (Hct) de *P. lineatus* provenientes de Berisso y Atalaya, respectivamente.

En primer lugar se estudiaron las posibles diferencias entre sexos para cada muestreo y para cada uno de los parámetros estudiados. Posteriormente se analizaron las diferencias entre los distintos muestreos trabajando con los promedios.

Los parámetros hematológicos de *P. lineatus* de Berisso, no presentaron diferencias significativas entre sexos ( $p > 0,05$ ). Por esto se pudo calcular un valor promedio para cada parámetro y muestreo.

La concentración de hemoglobina no presentó diferencias significativas entre los muestreos ( $p > 0,05$ ). Así, se pudo calcular un valor promedio total.

El hematocrito tampoco presentó diferencias significativas entre los muestreos ( $p > 0,05$ ). Estos resultados posibilitaron calcular un hematocrito promedio total.

Tabla 30. Concentración de hemoglobina y hematocrito ( $x \pm DE$ ) en *P. lineatus* de Berisso.

<b>Muestreo</b>		<b>n</b>	<b>Hb (g dl<sup>-1</sup>)</b>	<b>Hct (%)</b>
<b>Oct-02</b>	H	3	6,4 ± 2,1	41 ± 16
	M	6	6,7 ± 0,7	40 ± 7
	AS	9	6,6 ± 1,2	40 ± 10
<b>Abr-03</b>	H	7	9,6 ± 3,3	49 ± 9
	M	4	7,3 ± 0,7	43 ± 5
	AS	11	8,8 ± 2,8	47 ± 8
<b>Nov-03</b>	H	8	9,1 ± 1,0	44 ± 4
	M	3	10,6 ± 1,2	46 ± 7
	AS	11	9,5 ± 1,2	45 ± 5
<b>Total</b>	<b>H</b>	<b>18</b>	<b>8,8 ± 2,3</b>	<b>44 ± 9</b>
	<b>M</b>	<b>13</b>	<b>7,9 ± 2,0</b>	<b>41 ± 8</b>
	<b>AS</b>	<b>31</b>	<b>8,4 ± 2,2</b>	<b>43 ± 9</b>

n = número de individuos; H = hembras; M = machos; AS = ambos sexos

Para *P. lineatus* de Atalaya, el contenido de hemoglobina y el hematocrito no presentaron diferencias significativas entre sexos ( $p>0,05$ ). Por consiguiente, se calculó un valor promedio para cada muestreo.

Los niveles promedio de hemoglobina no presentaron diferencias significativas entre los muestreos ( $p>0,05$ ). Esto permitió calcular un nivel de hemoglobina promedio.

El hematocrito tampoco presentó diferencias significativas entre los muestreos ( $p>0,05$ ). Estos resultados permitieron calcular un valor de hematocrito promedio total.

Tabla 31. Concentración de hemoglobina y hematocrito ( $\bar{x} \pm DE$ ) en *P. lineatus* de Atalaya.

<b>Muestreo</b>		<b>n</b>	<b>Hb (g dl<sup>-1</sup>)</b>	<b>Hct (%)</b>
<b>Nov-02</b>	H	3	10,1 ± 3,2	37 ± 8
	M	3	6,1 ± 1,8	29 ± 9
	AS	6	8,5 ± 3,3	34 ± 8
<b>Oct-03</b>	H	4	7,0 ± 0,9	37 ± 7
	M	3	8,0 ± 0,8	44 ± 4
	AS	7	7,3 ± 0,9	39 ± 7
<b>Abr-04</b>	H	3	9,2 ± 0,1	50 ± 10
	M	5	10,6 ± 1,1	50 ± 8
	AS	8	10,4 ± 1,1	50 ± 9
<b>Total</b>	<b>H</b>	<b>10</b>	<b>8,3 ± 2,3</b>	<b>39 ± 9</b>
	<b>M</b>	<b>11</b>	<b>9,0 ± 2,2</b>	<b>44 ± 11</b>
	<b>AS</b>	<b>21</b>	<b>8,7 ± 2,2</b>	<b>41 ± 10</b>

n = número de individuos; H = hembras; M = machos; AS = ambos sexos

Para *P. lineatus* provenientes de Corrientes, la concentración promedio de Hb fue de  $10,0 \pm 0,8$  g dl<sup>-1</sup>, con un rango de variación de 9,3 a 10,8 g dl<sup>-1</sup> y el Hct promedio fue de  $48 \pm 4$  %, con un rango de variación de 45 a 52 %.

#### V. 6. 1. Parámetros hematológicos y su relación con la actividad del ALA-D y el nivel de plomo

En las Tabla 32 y 33 se presentan los coeficientes de correlación de Pearson para los parámetros hematológicos con la actividad de la enzima ALA-D y los niveles de plomo de *P. lineatus* de Berisso y Atalaya, respectivamente.

Tabla 32. Coeficientes de correlación de Pearson en *P. lineatus* de Berisso.

		<i>Hb</i>	<i>Hct</i>
<b>Sangre</b>	<b>ALA-D</b>	-0,34	-0,28
	<b>%I</b>	0,10	0,06
	<b>Pb</b>	0,29	0,29
<b>Hígado</b>	<b>ALA-D</b>	-0,06	-0,01
	<b>Pb</b>	<b>0,55</b>	0,33
<b>Branquias</b>	<b>Pb</b>	<b>0,60</b>	0,42

En negrita correlación significativa ( $p < 0,05$ )

Para *P. lineatus* de Berisso se registraron coeficientes de correlación positivos y significativos entre la concentración de hemoglobina y los niveles de plomo en hígado y branquias ( $p < 0,05$ ).

Tabla 33. Coeficientes de correlación de Pearson en *P. lineatus* de Atalaya.

		<i>Hb</i>	<i>Hct</i>
<b>Sangre</b>	<b>ALA-D</b>	0,01	-0,24
	<b>Pb</b>	0,31	0,07
<b>Hígado</b>	<b>ALA-D</b>	0,03	-0,25
	<b>Pb</b>	0,20	<b>0,69</b>
<b>Branquias</b>	<b>Pb</b>	0,33	0,45

En negrita correlación significativa ( $p < 0,05$ )

Con respecto a *P. lineatus* de Atalaya sólo se observó un coeficiente de correlación positivo y significativo entre el hematocrito y el nivel de plomo en hígado ( $p < 0,05$ ).

## V. 6. 2. Variación en los parámetros hematológicos entre zonas

En la Fig. 63 se muestra la concentración de hemoglobina de *P. lineatus* provenientes de distintas zonas del río de la Plata y Paraná. No se observaron diferencias significativas entre las distintas zonas de muestreo ( $p > 0,05$ ).

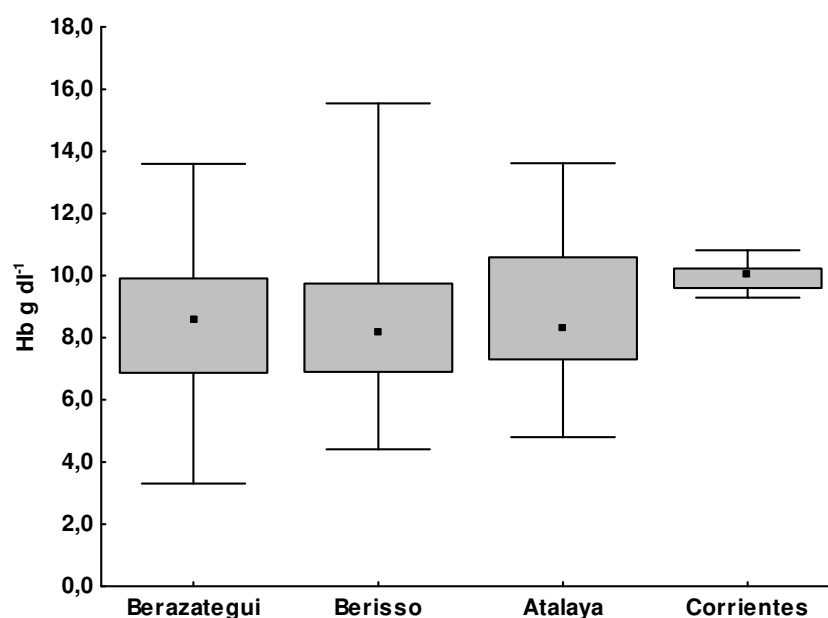


Fig. 63. Contenido de hemoglobina en g dl<sup>-1</sup> de *P. lineatus* de distintas zonas de los ríos de la Plata y Paraná.

En la Fig. 64 se presentan los valores de hematocrito de *P. lineatus* provenientes de distintas zonas; no encontrándose diferencias significativas entre ellas ( $p > 0,05$ ).

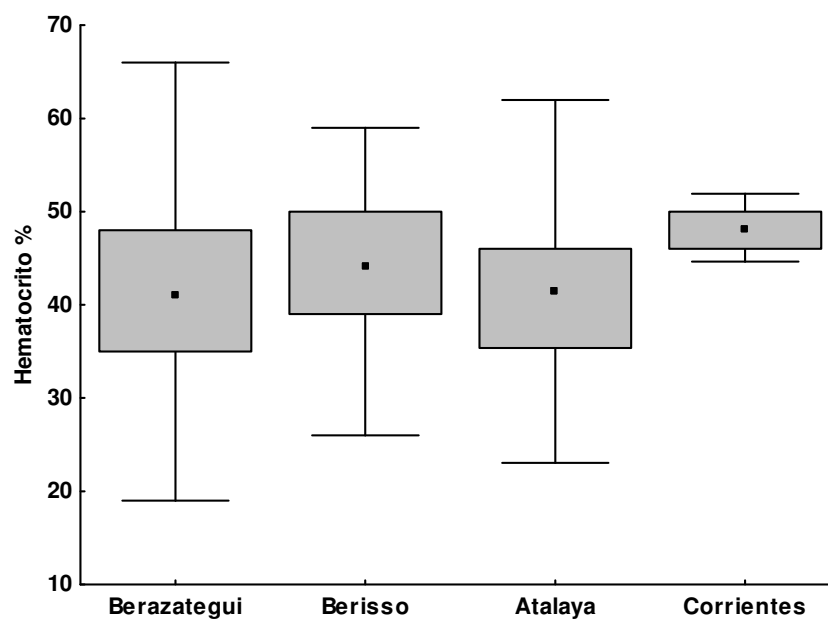


Fig. 64. Hematocrito en % de *P. lineatus* de distintas zonas de los ríos de la Plata y Paraná.

## V. 7. Discusión

Los resultados obtenidos hasta aquí mostraron algunas similitudes entre los peces de Berisso y Berazategui

En cuanto a la actividad de la enzima ALA-D en sangre, los peces de Berisso mostraron niveles de actividad y un grado de inhibición similares a los registrados en Berazategui. Mientras que los de Atalaya y Corrientes presentaron mayor actividad enzimática sin registrarse inhibición. Por el contrario, la actividad de la enzima hepática no reflejó diferencias entre zonas.

En este punto podríamos afirmar que la actividad de la enzima ALA-D hepática en *P. lineatus* no constituye un parámetro biomarcador de exposición a plomo. En ningún caso mostró variaciones en su actividad ni siquiera en los ensayos de laboratorio, donde la respuesta de la enzima en sangre se magnificó con respecto a lo registrado en campo. Otros autores han registrado resultados similares tanto en estudios clínicos en humanos (Secchi et al., 1974), de campo en aves (Vanparys et al., 2008) como de laboratorio en ratas y peces (Santos et al., 1999; Campana et al., 2003). Por otro lado, los estudios realizados en peces que reportan una inhibición significativa de la actividad de ALA-D hepática dependiente de plomo son ensayos *in vitro* (Rodrigues et al., 1989; Conner y Fowler, 1994) o de exposición *in vivo* a concentraciones elevadas de plomo, por encima de los 10000 ppb (Jackim, 1973).

Los resultados encontrados hasta aquí siguen sustentando la hipótesis de que existen diferencias estructurales en la enzima de ambos tejidos. Por otro lado, estos resultados también pueden ser explicados por la presencia en el hígado de proteínas más afines al plomo que el ALA-D; mientras que en sangre se ha demostrado que la proteína más afín al plomo es el ALA-D (Bergdahl et al., 1997). Considerando el valor de Km aparente calculado para la enzima en ambos tejidos, éste resultó mucho menor en hígado indicando que en este tejido la enzima es más afín a su sustrato que en sangre, pudiendo ser éste otro factor que contribuye a la menor sensibilidad de la enzima hepática con respecto al plomo.

En cuanto a los índices morfométricos: en ninguna de las zonas se encontraron diferencias entre sexos como tampoco entre muestreos, excepto para el IHS en Atalaya. Al igual que lo planteado para *P. lineatus* de Berazategui, Berisso y Atalaya no constituyen zonas de reproducción, dato corroborado otra vez por la observación de gónadas inmaduras en la totalidad de los especímenes recolectados.

Por otro lado, el aporte de nutrientes parece ser constante a lo largo del año. La comparación entre zonas mostró mayores valores de ambos índices en los peces provenientes de Berazategui y Berisso. Evidentemente la residencia en zonas cercanas a descargas cloacales le aporta a estos peces una importante fuente de materia orgánica que provoca un aumento en el factor de condición. Por otro lado es bien sabido que los contaminantes orgánicos se encuentran asociados a la materia orgánica, en consecuencia estos peces también incorporan una importante carga de contaminantes orgánicos que pueden inducir un aumento del índice hepato-somático.

Los niveles de plomo registrados en sangre de *P. lineatus* de Berazategui y Berisso también presentaron rangos similares. Generalizando, en estas zonas se encontraron niveles entre 8 y 14  $\mu\text{g dl}^{-1}$ , mientras que en Atalaya se registraron niveles inferiores a 8  $\mu\text{g dl}^{-1}$  y superiores a 3  $\mu\text{g dl}^{-1}$  y en Corrientes inferiores a 4  $\mu\text{g dl}^{-1}$ . En cuanto a los niveles registrados en tejido hepático a grandes rasgos se podría decir que Berazategui y Berisso presentaron rangos similares y mayores que los reportados para Atalaya y Corrientes. Por el contrario los niveles registrados en branquias resultaron similares entre las distintas zonas. Estos resultados sugieren que los peces provenientes de zonas cercanas a descargas cloacales tienden a bioacumular mayores niveles de plomo en sangre y tejido hepático.

Por otro lado, las concentraciones de plomo determinadas en tejido hepático y branquias de *P. lineatus* presentaron variaciones en el tiempo similares en ambos tejidos para cada zona estudiada. Sin embargo, en cada zona se verificaron diferencias en cuanto al tejido que presentó los niveles más elevados de este metal. En líneas generales, los peces de Berazategui presentaron niveles más elevados en tejido hepático que en branquia; a excepción del período septiembre 2003- febrero 2004. En Berisso los niveles en ambos tejidos resultaron similares, mientras que en Atalaya y Corrientes se presentaron mayores niveles en branquias. Otros autores (Barnhoorn, 1996; Coetzee, 1996; Kotze, 1997; Latif et al., 1982; Nussey et al., 2000; Seymore, 1994; Somero et al., 1977; Villegas-Navarro et al., 1989; Wepener, 1997) realizaron estudios sobre la acumulación de plomo en distintos tejidos de peces, encontrando una mayor acumulación en branquia que en hígado.

La concentración de determinado metal no puede ser estimada en una escala absoluta, ya que su significancia depende del tejido y de la especie estudiada (Rainbow, 1987,1988,1990,1993,1996). Por tanto, una concentración determinada

que es atípicamente alta para una especie puede ser considerada muy baja para otra (Rainbow, 2002). Así, la comparación con reportes de otros autores sobre la presencia de determinada concentración de metales en especies y ambientes diferentes no permiten evaluar estrictamente el impacto ambiental ni los posibles efectos tóxicos de esta concentración en *P. lineatus*.

Los niveles de plomo determinados en sangre, hígado y branquias son considerados buenos indicadores ambientales de exposición al plomo (Dural et al, 2007). Estos tejidos cumplen importantes funciones en el metabolismo, distribución y acumulación de metales. Cuando un pez es expuesto a metales en el medio acuático, existen cuatro rutas posibles para que incorpore el metal; pueden absorberlo directamente del ambiente, vía branquias o piel, o a través de la ingestión de agua o comida (Van der Putte et al., 1982). Los niveles de metales en hígado y branquias muestran diferencias en cuanto a las vías de ingreso de los mismos. Los niveles en branquia reflejan una vía de incorporación directa desde el agua ya que las branquias son sitios de captación de iones presentes en el agua, por lo que la concentración de metales en este tejido reflejaría la concentración de metales en agua. Los niveles en hígado representan principalmente la incorporación a través de la dieta (Alquezar et al, 2006). Independientemente de la vía de ingreso, una vez incorporado, el metal usualmente se liga a proteínas que lo transportan por sangre hacia algún tejido de almacenamiento, o al hígado para su almacenamiento o posterior distribución (Yilmaz et al, 2007). Así el nivel de plomo que se encuentra en sangre representa la suma del metal recientemente incorporado y el destinado a almacenamiento y excreción. Considerando que *P. lineatus* es una especie iliófaga, la incorporación de metales a través de la dieta, por ingestión de sedimentos, puede constituir una vía de ingreso tanto o más significativa que a través de las branquias. Así, las diferencias encontradas entre las distintas zonas estarían reflejando las diferencias en los niveles de plomo en los sedimentos. Además, los metales no esenciales, como el plomo tienden a acumularse en órganos o tejidos, como el hígado, que posibilitan su detoxificación o excreción (Depledge y Rainbow, 1990). Para esta especie el nivel de plomo hepático sería un mejor indicador ambiental de la exposición a plomo que branquias. Sin embargo la bioacumulación de plomo en tejido hepático de *P. lineatus* no se correlacionó con la inhibición de la actividad de la enzima ALA-D; posiblemente debido a la existencia de otras proteínas hepáticas más afines al plomo que el ALA-D (Santos et al., 1999).

Los niveles de plomo en los distintos tejidos de *P. lineatus* no mostraron diferencias entre sexos en ninguna de las distintas zonas. Otros autores tampoco encontraron diferencias entre sexos en los niveles de plomo en tejido hepático y branquias (Nussey et al, 2000).

Al analizar las relaciones entre la actividad de la enzima y los niveles de plomo, otra vez se encontraron similitudes entre los peces de Berazategui y Berisso. Estos últimos mostraron una correlación significativa entre la actividad de ALA-D y el nivel de plomo sanguíneo, aunque los coeficientes de correlación resultaron bajos. En peces de Berisso también se pudo calcular un porcentaje de inhibición con el cual se obtuvo una mejor correlación con el nivel de plomo sanguíneo. Los valores de NOEL y  $Cl_{50}$  mostraron claras similitudes entre ambas zonas. Por el contrario, Atalaya no mostró correlaciones significativas entre la actividad de la enzima y el nivel de plomo en sangre. Estos resultados son esperables si consideramos que no existe una inhibición de la actividad de la enzima.

En esta etapa cabe preguntarnos sobre costo-beneficio. Evidentemente los sábalos residentes en Berazategui y Berisso se encuentran en zonas donde el plomo se encuentra biodisponible, pero por otro lado las descargas cloacales constituyen una muy buena fuente de alimentación constante a lo largo del año, a pesar de que esa gran cantidad de materia orgánica trae aparejado un importante aporte de contaminantes. Considerando aisladamente al plomo parecería que el beneficio es mayor al costo, ya que se observa bioacumulación de plomo en los tejidos estudiados, y una inhibición del ALA-D sólo en sangre, que se mantiene constante en el tiempo. El sábalo ¿se encuentra adaptado a estas condiciones de exposición crónica manteniendo un nivel de inhibición que no afecta a los parámetros hematológicos ni a los morfométricos? Los resultados obtenidos parecen sugerir que así es. Es más, el FC registrado en estas zonas resultó más elevado, indicando que los peces poseen mayor peso corporal en relación a su longitud en comparación con otras zonas.

## **VI. Niveles de actividad de la enzima ALA-D en *Leporinus obtusidens* y *Cyprinus carpio* de distintas zonas del río de la Plata**

Los estudios realizados con *P. lineatus* mostraron que existe inhibición de la enzima ALA-D en las dos zonas influenciadas por descargas cloacales y que el grado de inhibición calculado a partir de la reactivación de la enzima sanguínea constituye un buen biomarcador de exposición específico para plomo. De acuerdo a estos resultados se procedió a realizar estudios con otras especies residentes en las mismas zonas a fin de validar el uso de ALA-D como biomarcador para peces en general. Para esto se decidió muestrear individuos de dos especies omnívoras pero de hábitos distintos, una pelágica, *Leporinus obtusidens* (Boga) y otra bentónica, *Cyprinus carpio* (Carpa). La razón de esta elección fue determinar si en una misma comunidad el plomo se encuentra biodisponible para especies que exhiben diferentes estrategias alimenticias y si la enzima ALA-D presentaba diferencias interespecíficas en cuanto a su sensibilidad.

En primer lugar, se caracterizó la enzima ALA-D. Específicamente se estudió la actividad de la enzima en función del pH del medio de incubación y la concentración de sustrato. También se estudió el efecto de la concentración de  $Zn^{2+}$  sobre la actividad enzimática.

### **VI. 1. Caracterización de la enzima ALA-D en sangre**

#### **VI. 1. 1. Actividad de la enzima ALA-D en función del pH del medio de incubación**

El efecto del pH del medio de incubación sobre la actividad de la enzima se evaluó considerando las actividades porcentuales respecto del máximo valor observado. Los resultados obtenidos en *L. obtusidens* se presentan en la Fig. 65. Las máximas actividades enzimáticas se registraron en el rango de  $pH = 5,8 - 6,2$ .

En la Fig. 66 se muestra la relación entre la actividad de la enzima y el pH del medio de incubación en *C. carpio*. Se observó que la enzima presentó máxima actividad en el rango de pH = 5,8 – 6,6.

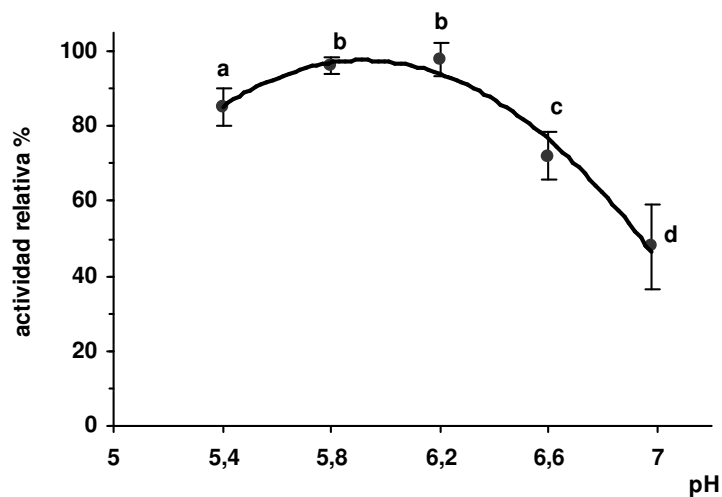


Fig. 65. Actividad de la enzima ALA-D en sangre de *L. obtusidens* en función del pH del medio de incubación. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

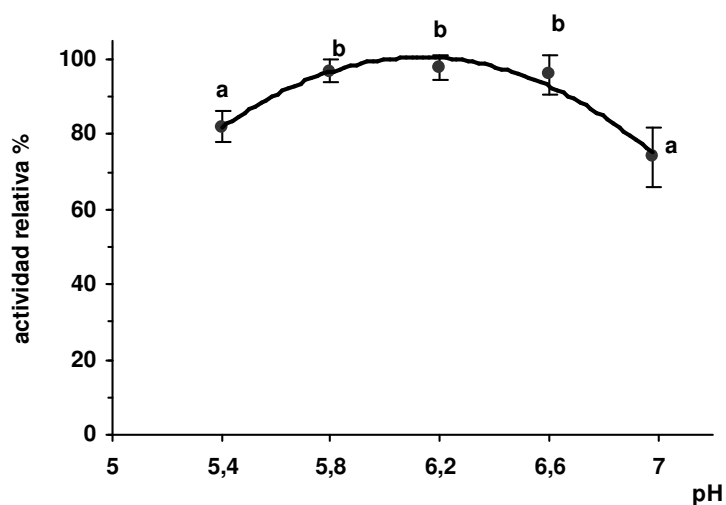


Fig. 66. Actividad de la enzima ALA-D en sangre de *C. carpio* en función del pH del medio de incubación. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## VI. 1. 2. Actividad de la enzima ALA-D en función de la concentración de sustrato

En la Fig. 67 se presenta la relación entre la actividad de la enzima y la concentración del sustrato (ALA) en *L. obtusidens*. El  $K_m$  aparente de la enzima para el ALA se estimó a partir de un análisis de Lineweaver-Burk, el cual resultó igual a 0,49 mM.

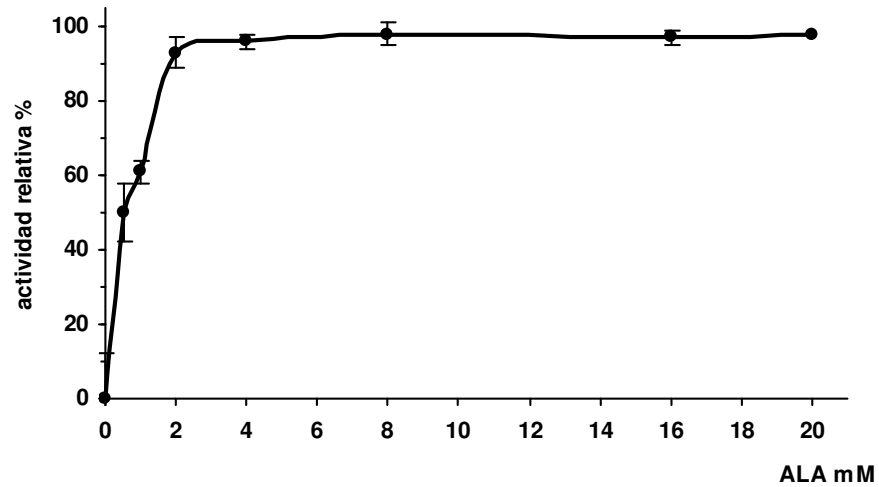


Fig. 67. Actividad de la enzima ALA-D en sangre de *L. obtusidens* en función de la concentración de ALA.

En la Fig. 68 se muestran los valores correspondientes a muestras de sangre de *C. carpio*. El  $K_m$  aparente fue de 0,39 mM.

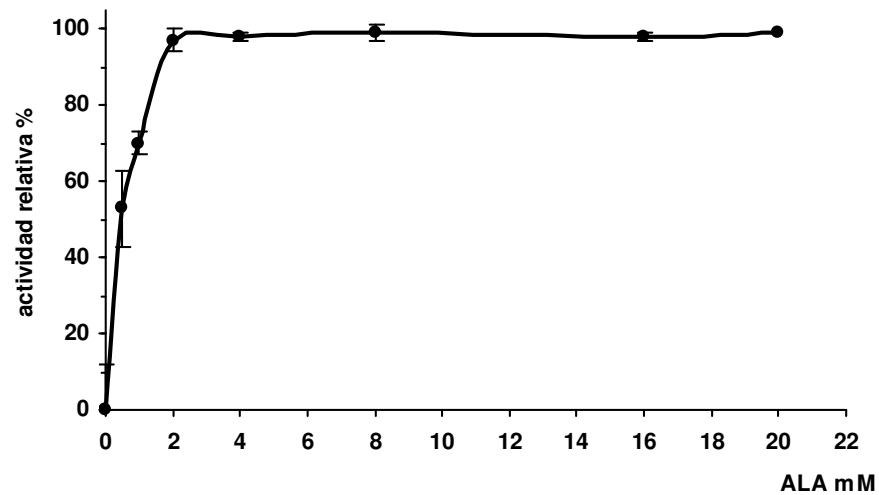


Fig. 68. Actividad de la enzima ALA-D en sangre de *C. carpio* en función de la concentración de ALA.

### VI. 1. 3. Reactivación de la actividad sanguínea de la enzima ALA-D mediante el empleo de $Zn^{2+}$

El efecto de la concentración de  $Zn^{2+}$  sobre la actividad de la enzima se evaluó considerando las actividades porcentuales respecto del máximo valor observado.

En la Fig. 69 se presentan los resultados obtenidos con el empleo de distintas concentraciones de  $Zn^{2+}$  sobre la actividad de la enzima ALA-D en muestras de sangre de *L. obtusidens*. La actividad de la enzima ALA-D presentó niveles máximos a concentraciones de  $Zn^{2+}$  entre 15 y 20  $\mu M$  ( $p < 0,05$ ).

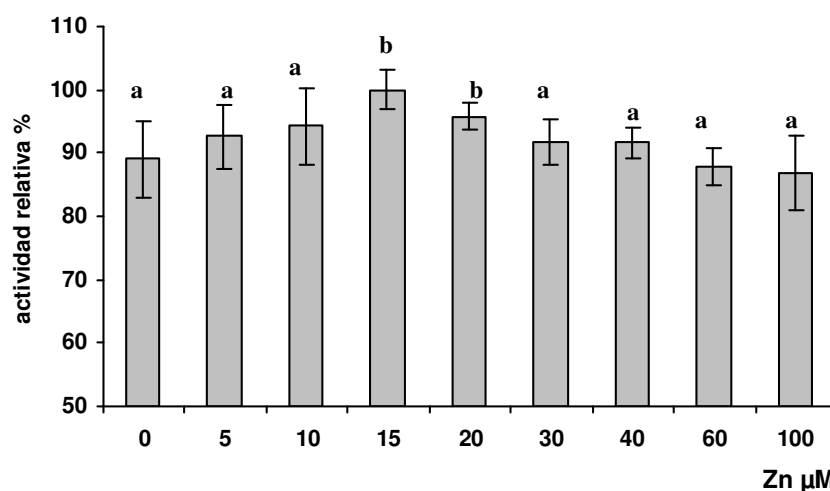


Fig. 69. Actividad relativa de la enzima ALA-D sanguínea en función de la concentración de  $Zn^{2+}$  en *L. obtusidens*. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas con respecto al control (sin  $Zn^{2+}$ ;  $p < 0,05$ ).

En la Fig. 70 se muestran los resultados registrados en *C. carpio*. En esta especie, se observó que la actividad máxima de la enzima se presentó en un rango más amplio de concentraciones de  $Zn^{2+}$ , el cual fue de 15 a 40  $\mu M$ .

Los resultados obtenidos en estas especies concuerdan con los estudios realizados en *P. lineatus* (capítulo III); e indican que la actividad de la enzima es dependiente de  $Zn^{2+}$ . Para obtener la máxima reactivación se requieren concentraciones cercanas a 15  $\mu M$  de  $Zn^{2+}$  ( $p < 0,05$ ).

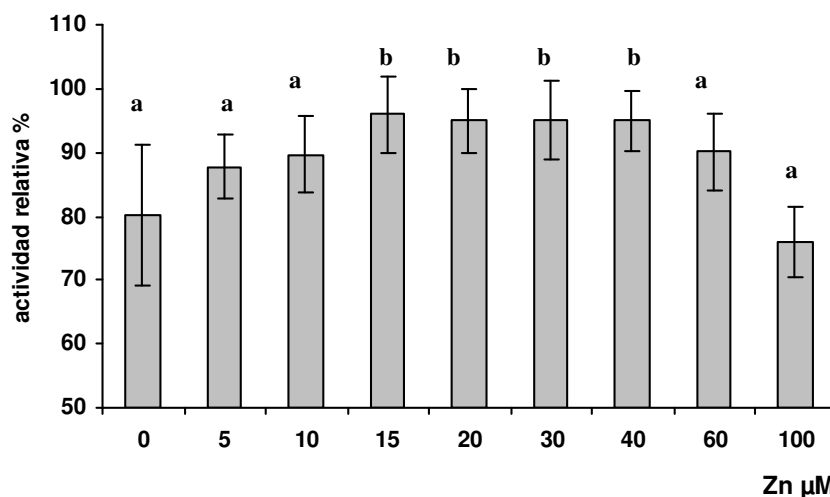


Fig. 70. Actividad relativa de la enzima ALA-D en función de la concentración de  $Zn^{2+}$  en *C. carpio*. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas con respecto al control (sin  $Zn^{2+}$ ;  $p < 0,05$ ).

## VI. 2. Niveles de actividad de la enzima ALA-D en muestras de sangre

En la Tabla 34 se presentan los niveles de actividad de ALA-D y ALA-D<sub>R</sub> en muestras de sangre de *L. obtusidens* provenientes de Berazategui, Berisso y Atalaya. Los datos corresponden a muestras de individuos machos recolectados durante octubre – diciembre de 2003. Por consiguiente sólo se analizaron las diferencias en la actividad enzimática entre zonas y entre el ALA-D y ALA-D<sub>R</sub> para cada zona.

Tabla 34. Actividad de la enzima ALA-D ( $x \pm DE$ ) de *L. obtusidens* machos de Berazategui, Berisso y Atalaya.

Zona	n	ALA-D ( $U ml GR^{-1}$ )	ALA-D <sub>R</sub> ( $U ml GR^{-1}$ )
<b>Berazategui (Dic-2003)</b>	6	1026 ± 283	1148 ± 272
<b>Berisso (Oct-2003)</b>	4	1075 ± 296	1160 ± 269
<b>Atalaya (Nov-2003)</b>	4	1163 ± 310	1231 ± 220

n = número de individuos.

La comparación de la actividad de la enzima ALA-D entre zonas mostró que no existen diferencias significativas entre ellas ( $p > 0,05$ ). Por otro lado, tampoco se observaron diferencias significativas entre la actividad de ALA-D y del ALA-D<sub>R</sub> en

ninguna de las zonas estudiadas ( $p > 0,05$ ), en consecuencia para *L. obtusidens* no se consideró un %I.

En la Tabla 35 se presentan los niveles de actividad de ALA-D y ALA-D<sub>R</sub> en muestras de sangre de *C. carpio* provenientes de Berazategui, Berisso y Atalaya. Los datos corresponden a muestras de individuos machos recolectados durante septiembre – noviembre de 2003.

Tabla 35. Actividad de la enzima ALA-D ( $x \pm DE$ ) de *C. carpio* machos de Berazategui, Berisso y Atalaya.

Zona	n	ALA-D (U ml GR <sup>-1</sup> )	ALA-D <sub>R</sub> (U ml GR <sup>-1</sup> )	%I
<b>Berazategui (Sep-2003)</b>	5	995 ± 187 <sup>a</sup>	1309 ± 107 <sup>b</sup>	3 ± 11
<b>Berisso (Nov-2003)</b>	3	990 ± 220 <sup>a</sup>	1431 ± 187 <sup>b</sup>	32 ± 5
<b>Atalaya (Oct-2003)</b>	9	1269 ± 307 <sup>a,b</sup>	1386 ± 288 <sup>b</sup>	ND

n = número de individuos; ND = no determinado. Letras distintas corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

La actividad de ALA-D no presentó diferencias significativas entre zonas ( $p > 0,05$ ).

El análisis de las diferencias entre la actividad de ALA-D y ALA-D<sub>R</sub> mostró diferencias significativas para los ejemplares provenientes de Berazategui y Berisso ( $p < 0,05$ ). Por lo tanto se calculó un %I enzimática para *C. carpio* de estas zonas, los cuales no presentaron diferencias significativas entre ellos ( $p > 0,05$ ).

### VI. 3. Índices morfométricos

En las Fig. 71 y 72 se presentan los valores correspondiente al factor de condición de *L. obtusidens* y *C. carpio*, respectivamente.

El FC de ambas especies no presentó diferencias significativas entre las distintas zonas ( $p > 0,05$ ).

### VI. 4. Niveles de plomo en muestras de tejido hepático y branquias

En la Fig. 73 se presentan los niveles de plomo en tejido hepático y branquias correspondientes a *L. obtusidens* de Berazategui, Berisso y Atalaya.

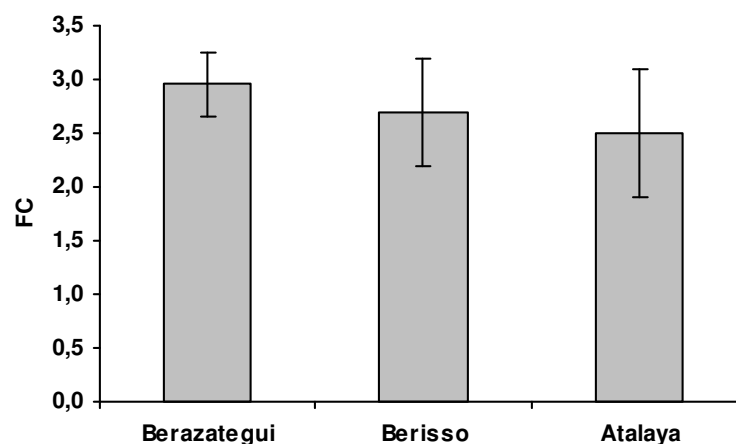


Fig. 71. FC ( $x \pm DE$ ) de *L. obtusidens* de Berazategui, Berisso y Atalaya.

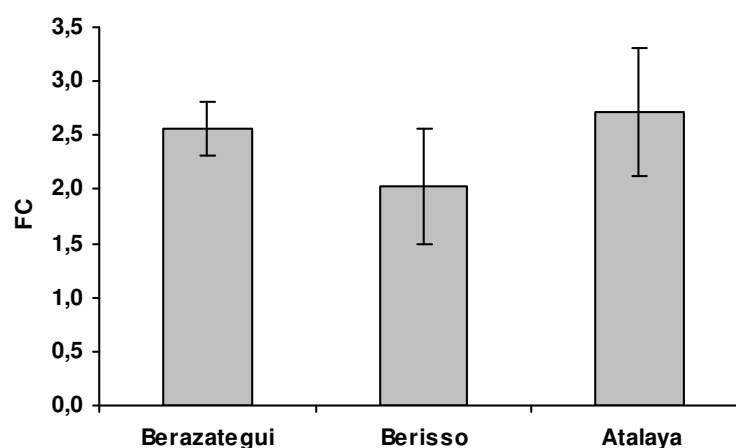


Fig. 72. FC ( $x \pm DE$ ) de *C. carpio* de Berazategui, Berisso y Atalaya.

Los niveles de plomo registrados en muestras de tejido hepático no presentaron diferencias significativas entre zonas ( $p > 0,05$ ); mientras que los niveles de plomo determinados en branquias de *L. obtusidens* de Atalaya resultaron significativamente menores que los de Berisso y Berazategui ( $p < 0,05$ ). En las tres zonas la concentración de plomo en branquias resultó ligeramente mayor que en hígado ( $p < 0,05$ ).

En la Fig. 74 se presentan los niveles de plomo registrados en muestras de tejido hepático y branquias de *C. carpio* provenientes de Atalaya, Berisso y Berazategui.

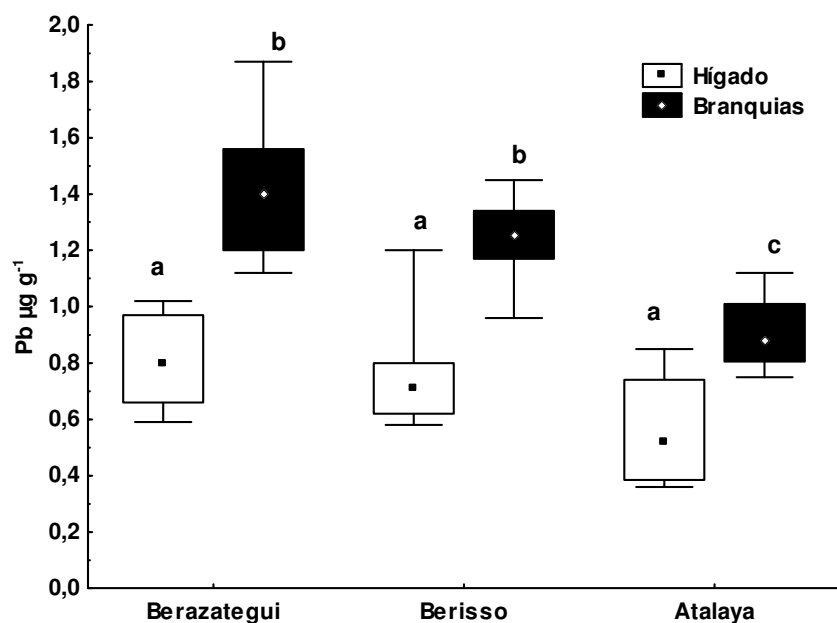


Fig. 73. Niveles de Pb en  $\mu\text{g g}^{-1}$  en muestras de hígado y branquias de *L. obtusidens* de Berazategui, Berisso y Atalaya. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

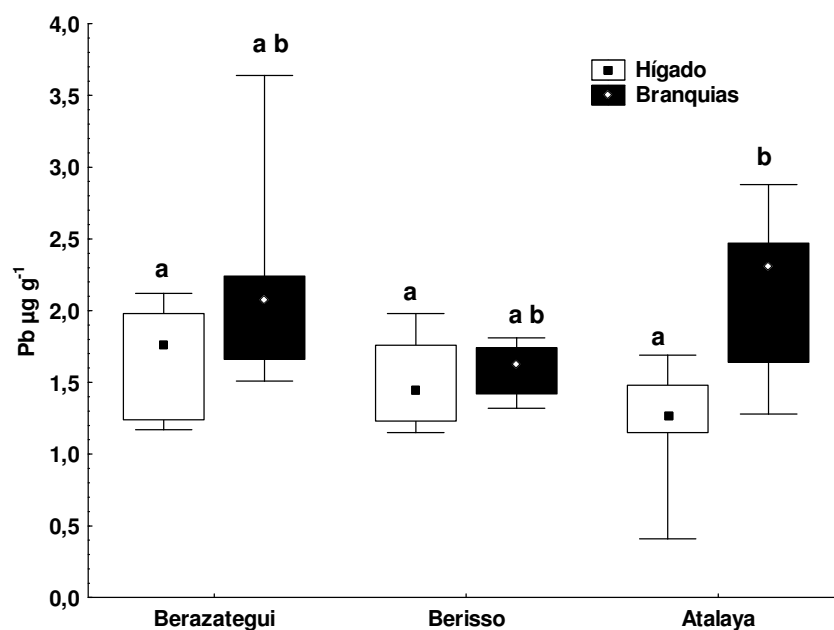


Fig. 74. Niveles de Pb en  $\mu\text{g g}^{-1}$  en muestras de hígado y branquias de *C. carpio* de Berazategui, Berisso y Atalaya. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Los niveles de plomo de *C. carpio* no mostraron diferencias significativas entre las distintas zonas, para ninguno de los tejidos estudiados ( $p > 0,05$ ). Las muestras de branquias de los peces de Atalaya presentaron niveles de plomo

ligeramente más elevados en relación al tejido hepático ( $p < 0,05$ ); mientras que en Berazategui y Berisso los niveles de plomo registrados en ambos tejidos resultaron similares ( $p > 0,05$ ).

## VI. 5. Parámetros hematológicos

En las tablas 36 y 37 se presentan la concentración de hemoglobina (Hb) y el hematocrito (Hct) de *L. obtusidens* y *C. Carpio*, respectivamente. Se analizaron las diferencias para cada parámetro hematológico de cada especie entre zonas.

Tabla 36. Concentración de hemoglobina y hematocrito ( $x \pm DE$ ) de *L. obtusidens* de Berazategui, Berisso y Atalaya.

Zona	n	Hb (g dl <sup>-1</sup> )	Hct (%)
<b>Berazategui (Dic-2003)</b>	6	11,0 $\pm$ 2,1	55 $\pm$ 10
<b>Berisso (Oct-2003)</b>	4	10,4 $\pm$ 2,8	46 $\pm$ 5
<b>Atalaya (Nov-2003)</b>	4	9,3 $\pm$ 2,0	44 $\pm$ 4

n = número de individuos.

Tanto el contenido de hemoglobina como el hematocrito de *L. obtusidens* no presentaron diferencias significativas entre zonas ( $p > 0,05$ ).

Tabla 37. Concentración de hemoglobina y hematocrito ( $x \pm DE$ ) de *C. carpio* de Berazategui, Berisso y Atalaya.

Zona	n	Hb (g dl <sup>-1</sup> )	Hct (%)
<b>Berazategui (Sep-2003)</b>	5	6,0 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	31 $\pm$ 5 <sup>c</sup>
<b>Berisso (Nov-2003)</b>	3	7,6 $\pm$ 1,5 <sup>ab</sup>	33 $\pm$ 13 <sup>cd</sup>
<b>Atalaya (Oct-2003)</b>	9	8,4 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>	42 $\pm$ 6 <sup>d</sup>

n = número de individuos. Letras distintas corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Para *C. carpio*, se registraron menores concentraciones de hemoglobina en los peces de Berazategui y mayores en los de Atalaya ( $p < 0,05$ ). Las mismas diferencias se observaron para el hematocrito ( $p < 0,05$ ).

## VI. 6. Discusión

Los resultados obtenidos con la caracterización de la enzima ALA-D sanguínea mostraron claras similitudes con la de *P. lineatus*, en cuanto al rango de pH óptimo y el valor de Km aparente. También el estudio del efecto de la concentración de Zn<sup>2+</sup> sobre la actividad enzimática presentó resultados similares a los registrados en *P. lineatus*, encontrándose que la actividad de la enzima en sangre de estas especies es dependiente de Zn<sup>2+</sup> y que la mayor reactivación se logra a concentraciones cercanas a 15 µM de Zn<sup>2+</sup>.

La actividad de la enzima ALA-D en muestras de sangre de *L. obtusidens* no presentó diferencias entre zonas así como tampoco mostró inhibición. Con respecto a *C. carpio*, si bien tampoco presentó diferencias entre zonas, mostró inhibición únicamente en Berazategui y Berisso, las mismas zonas donde se registró inhibición en *P. lineatus*.

Los niveles de plomo registrados en tejido hepático de *L. obtusidens* no mostraron diferencias entre zonas, mientras que en branquias los individuos procedentes de Berazategui y Berisso presentaron mayores concentraciones que los de Atalaya. Por otro lado, para cada zona los niveles registrados en branquias resultaron mayores que los de hígado. Para *C. carpio* no se registraron diferencias entre zonas para ninguno de los dos tejidos. Los individuos de Berazategui y Berisso mostraron niveles similares en ambos tejidos mientras que los de Atalaya presentaron mayor concentración de plomo en branquias. Comparando entre especies las mayores diferencias se observaron en los niveles de plomo hepático, ya que las especies bentónicas como *P. lineatus* y *C. carpio* presentaron mayores niveles que *L. obtusidens*, a excepción de *P. lineatus* de Atalaya, los cuales presentaron niveles similares a *L. obtusidens*. Es interesante resaltar que tanto en *P. lineatus* y *C. carpio* de Atalaya así como también en *L. obtusidens* de las tres zonas, donde no se registró una inhibición de la enzima ALA-D, los niveles de plomo determinados en branquias siempre fueron superiores a los de hígado. Mientras que en los individuos donde se observó inhibición de ALA-D el nivel de plomo en hígado aumenta y se equipara al de branquias. Es bien sabido que los metales se asocian a las partículas de sedimento, por lo que para los peces de hábitos bentónicos el plomo se encontraría más biodisponible y esto se refleja en los mayores niveles de este metal encontrados en tejido hepático y en la inhibición de la enzima ALA-D.

De acuerdo a estos resultados para la utilización del enzima ALA-D como biomarcador de plomo en un sistema como el río de la Plata proponemos medir la actividad de dicha enzima en especies de peces bentónicas.

## **VII. Niveles de actividad de la enzima ALA-D en *Cichlasoma facetum***

Una vez evaluada la situación de tres especies de peces en un sistema acuático natural expuestos a múltiples contaminantes y factores de estrés se procedió a estudiar la actividad de la enzima ALA-D en una población endogámica de *Cichlasoma facetum*, especie de hábito pelágico. La importancia de esta fase del trabajo radica en que los ejemplares utilizados provenían de un estanque artificial a cielo abierto, en el cual no se detectó la presencia de plomo en agua. De esta forma se podía estudiar la variabilidad natural en la actividad basal de la enzima ALA-D sin la interferencia de factores de estrés.

En este capítulo se presentan la caracterización y los niveles de actividad de la enzima ALA-D en muestras de sangre y tejido hepático de *C. facetum*.

### **VII. 1. Caracterización de la enzima ALA-D en tejido sanguíneo y hepático de *Cichlasoma facetum***

#### **VII. 1. 1. Sangre**

##### **VII. 1. 1. 1. Actividad de la enzima ALA-D en función del pH del medio de incubación**

En la Fig. 75 se muestra la relación entre la actividad de la enzima en sangre de *C. facetum* y el pH del medio de incubación. Se observó que la enzima presentó máxima actividad en el rango de pH = 5,8 - 6,6 ( $p < 0,05$ ).

##### **VII. 1. 1. 2. Actividad de la enzima ALA-D en función de la temperatura de reacción**

En la Fig. 76 se presenta la actividad de la enzima ALA-D en función de la temperatura de reacción. La actividad enzimática varió en función de la temperatura de reacción, observándose valores máximos en el rango de 55 – 75 °C ( $p < 0,05$ )

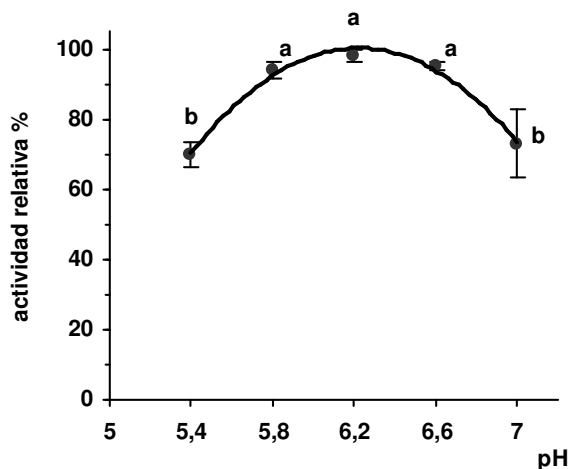


Fig. 75. Actividad de la enzima ALA-D en sangre de *C. facetum* en función del pH del medio de incubación. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

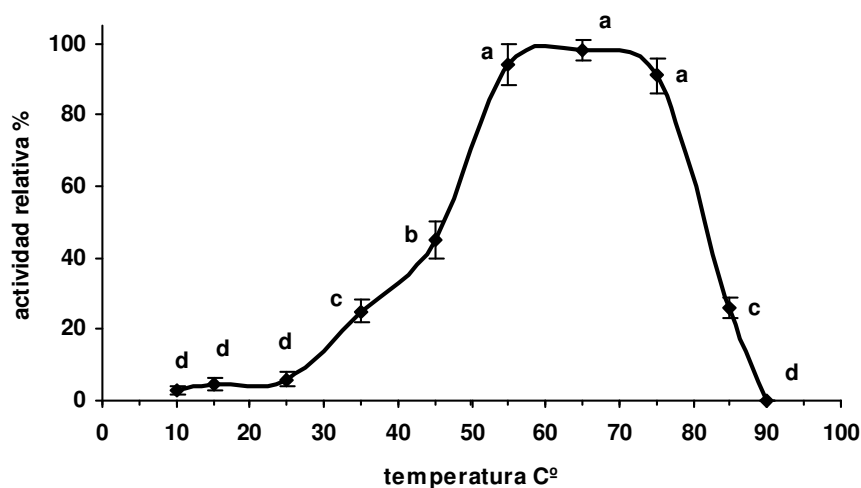


Fig. 76. Actividad de la enzima ALA-D en sangre de *C. facetum* en función de la temperatura de reacción. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### VII. 1. 1. 3. Actividad de la enzima ALA-D en función de la concentración de sustrato

En la Fig. 77 se muestra la actividad de la enzima ALA-D en función de la concentración de sustrato. El  $K_m$  aparente determinado a partir de Lineweaver-Burk, fue igual a 0,37 mM.

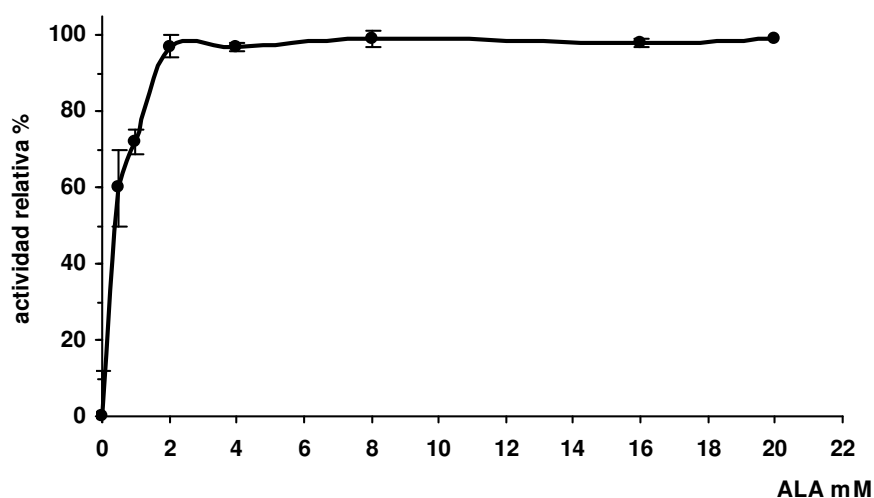


Fig. 77. Actividad de la enzima ALA-D en sangre de *C. facetum* en función de la concentración de ALA.

## VII. 1. 2. Tejido hepático

### VII.1. 2. 1. Actividad de la enzima ALA-D en función del pH del medio de incubación

En la Fig. 78 se muestra la relación entre la actividad de la enzima y el pH de la solución reguladora del medio de incubación. En esta especie, la actividad enzimática en hígado presentó máxima actividad a pH = 6,2 ( $p < 0,05$ )

### VII. 1. 2. 2. Actividad de la enzima ALA-D en función de la temperatura de reacción

En la Fig. 79 se presenta la relación entre la actividad de la enzima ALA-D y la temperatura de reacción. La actividad de la enzima varió en función de la temperatura de reacción, observándose actividades máximas en un rango de 55 – 75 °C ( $p < 0,05$ ).

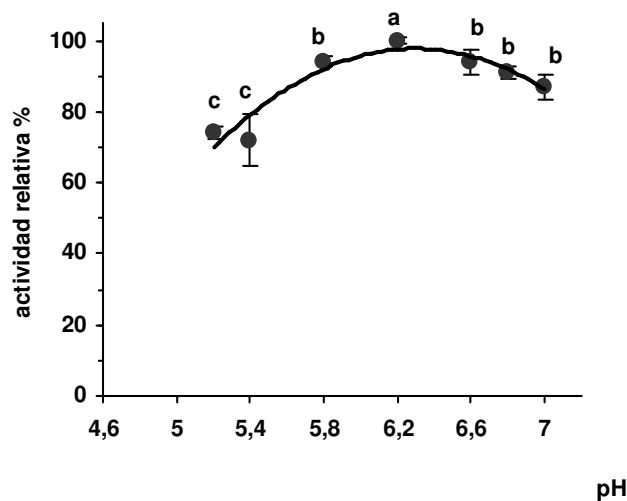


Fig. 78. Actividad de la enzima ALA-D en hígado de *C. facetum* en función del pH de la solución reguladora del medio de incubación. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

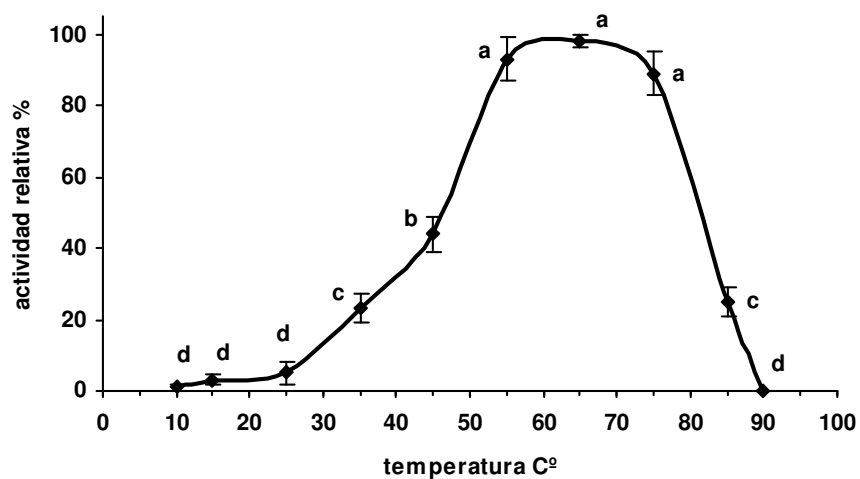


Fig. 79. Actividad de la enzima ALA-D en hígado de *C. facetum* en función de la temperatura de reacción. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### VII. 1. 2. 3. Actividad de la enzima ALA-D en función de la concentración de sustrato

En la Fig. 80 se muestra la actividad de la enzima ALA-D en función de la concentración de sustrato. El  $K_m$  aparente determinado a partir de Lineweaver-Burk fue igual a 0,05 mM.

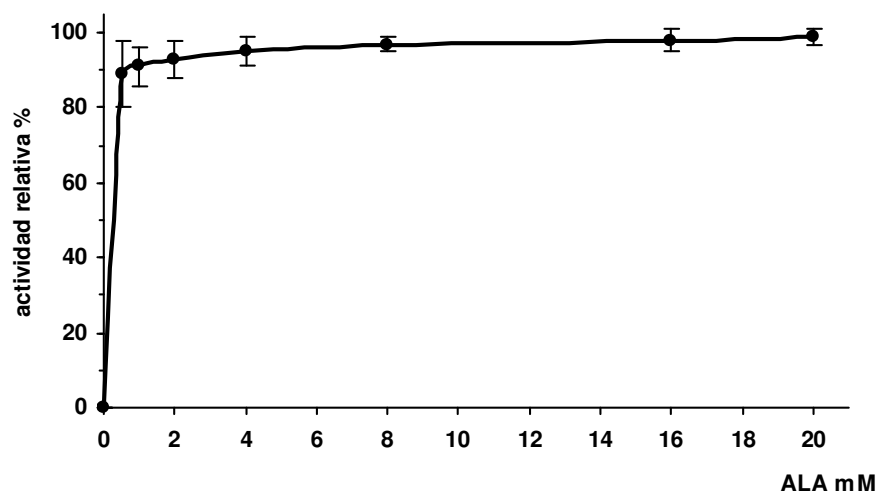


Fig. 80. Actividad de la enzima ALA-D en tejido hepático de *C. facetum* en función de la concentración de ALA.

## VII. 2. Niveles de actividad de la enzima ALA-D

### VII. 2. 1. Sangre

En la tabla 38 se presentan los valores correspondientes a la actividad del ALA-D y de ALA-D<sub>R</sub>.

En primer lugar se evaluaron las diferencias entre sexos, para cada muestreo. Las actividades de ALA-D y ALA-D<sub>R</sub> no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre sexos. Estos resultados posibilitaron calcular un valor de actividad promedio para cada muestreo.

Posteriormente se analizaron las diferencias entre los distintos muestreos para cada una de las variables, trabajando con los valores promedio de cada uno de ellos.

La actividad de ALA-D no presentó diferencias significativas entre los distintos muestreos ( $p > 0,05$ ). Por lo tanto se calculó un nivel de actividad promedio total.

Tabla 38. Actividad de la enzima ALA-D ( $x \pm DE$ ) de *C. facetum*.

<b>Muestreo</b>		<b>n</b>	<b>ALA-D (U ml GR<sup>-1</sup>)</b>	<b>ALA-D<sub>R</sub> (U ml GR<sup>-1</sup>)</b>
<b>Feb-01</b>	H	4	1230 ± 319	1317 ± 276
	M	3	1397 ± 254	1415 ± 262
	AS	7	1326 ± 273	1373 ± 250
<b>Abr-01</b>	H	4	1501 ± 210	1520 ± 248
	M	3	1487 ± 511	1547 ± 415
	AS	7	1494 ± 362	1535 ± 295
<b>Ago-01</b>	H	6	1119 ± 357	1189 ± 326
	M	3	1559 ± 414	1603 ± 418
	AS	9	1339 ± 422	1396 ± 405
<b>Nov-01</b>	H	4	1587 ± 706	1621 ± 690
	M	5	1037 ± 293	1066 ± 314
	AS	9	1262 ± 500	1343 ± 568
<b>Feb-02</b>	H	5	1440 ± 497	1492 ± 468
	M	3	1696 ± 327	1744 ± 279
	AS	8	1577 ± 420	1626 ± 387
<b>Abr-02</b>	H	7	1291 ± 308	1387 ± 231
	M	3	996 ± 120	1050 ± 271
	AS	10	1173 ± 272	1252 ± 349
<b>Ago-02</b>	H	5	1533 ± 293	1548 ± 307
	M	3	1493 ± 145	1534 ± 140
	AS	8	1513 ± 245	1540 ± 243
<b>Dic-02</b>	H	4	1331 ± 411	1412 ± 394
	M	3	911 ± 260	934 ± 273
	AS	7	1121 ± 362	1173 ± 377
<b>Feb-03</b>	H	4	1461 ± 326	1504 ± 309
	M	3	960 ± 270	1135 ± 273
	AS	7	1211 ± 383	1319 ± 330
<b>Abr-03</b>	H	4	1018 ± 352	1064 ± 392
	M	3	1266 ± 183	1351 ± 195
	AS	7	1142 ± 282	1208 ± 314
<b>Ago-03</b>	H	4	1641 ± 365	1668 ± 321
	M	4	1724 ± 345	1736 ± 345
	AS	8	1683 ± 321	1702 ± 350
<b>Nov-03</b>	H	4	1170 ± 245	1215 ± 314
	M	4	968 ± 524	1092 ± 491
	AS	8	1048 ± 405	1154 ± 366
<b>Total</b>	<b>H</b>	<b>55</b>	<b>1396 ± 452</b>	<b>1481 ± 458</b>
	<b>M</b>	<b>40</b>	<b>1354 ± 428</b>	<b>1430 ± 409</b>
	<b>AS</b>	<b>95</b>	<b>1374 ± 437</b>	<b>1455 ± 432</b>

n = número de individuos; H = hembras; M = machos; AS = ambos sexos

La actividad reactivada de la enzima tampoco presentó diferencias significativas entre los distintos muestreos ( $p>0,05$ ). Así, se pudo calcular un nivel de actividad promedio total.

Por último se analizaron las diferencias entre ALA-D y ALA-D<sub>R</sub>. No se observaron diferencias significativas entre ambas actividades ( $p>0,05$ ). Por esto se consideró que la enzima no se encontraba inhibida y no se calculó un %I.

## VII. 2. 2. Tejido hepático

En la tabla 39 se presenta la actividad específica de la enzima ALA-D en muestras de tejido hepático de *C. facetum*.

Tabla 39. Actividad específica de la enzima ALA-D ( $\bar{x} \pm DE$ ) en tejido hepático de *C. facetum*.

<b>Muestreo</b>	<b>n</b>	<b>Hembras</b> <b>U mg. prot.<sup>-1</sup></b>	<b>n</b>	<b>Machos</b> <b>U mg. prot.<sup>-1</sup></b>	<b>n</b>	<b>Ambos sexos</b> <b>U mg. prot.<sup>-1</sup></b>
<b>Feb-01</b>	4	6,7 ± 3,1	3	7,2 ± 1,2	7	7,0 ± 2,0
<b>Abr-01</b>	4	4,1 ± 1,3	3	3,8 ± 1,2	7	3,9 ± 1,2
<b>Ago-01</b>	6	5,5 ± 1,8	3	5,5 ± 2,1	9	5,5 ± 1,7
<b>Nov-01</b>	4	6,4 ± 0,8	5	4,6 ± 1,1	9	5,5 ± 1,3
<b>Feb-02</b>	5	5,1 ± 3,6	3	4,9 ± 1,1	8	5,0 ± 2,5
<b>Abr-02</b>	7	4,9 ± 2,2	3	4,4 ± 1,9	10	4,6 ± 1,9
<b>Ago-02</b>	5	3,9 ± 2,7	3	3,1 ± 1,0	8	3,5 ± 1,9
<b>Dic-02</b>	4	3,3 ± 3,3	3	2,4 ± 1,3	7	2,8 ± 2,3
<b>Feb-03</b>	4	5,6 ± 3,5	3	5,5 ± 2,8	7	5,6 ± 2,8
<b>Abr-03</b>	4	6,6 ± 1,9	3	4,3 ± 2,3	7	5,5 ± 2,3
<b>Ago-03</b>	4	4,5 ± 3,5	4	7,9 ± 3,9	8	6,2 ± 3,8
<b>Nov-03</b>	4	5,0 ± 1,6	4	8,6 ± 2,4	8	6,8 ± 2,7
<b>Total</b>	<b>51</b>	<b>5,1 ± 2,6</b>	<b>36</b>	<b>5,2 ± 2,4</b>	<b>87</b>	<b>5,1 ± 2,4</b>

n = número de individuos.

Al igual que con la actividad en muestras de sangre, primero se evaluaron las diferencias entre sexos, para cada muestreo. La actividad específica de la enzima ALA-D no presentó diferencias significativas entre sexos ( $p>0,05$ ). Estos resultados posibilitaron calcular un valor promedio total para cada muestreo.

Luego se analizaron las diferencias entre los distintos muestreos trabajando con los promedios de cada uno de ellos.

La actividad específica de la enzima no presentó diferencias significativas entre los muestreos ( $p>0,05$ ). Esto permitió calcular un nivel de actividad promedio total.

### **VII. 3. Índices morfométricos**

En la tabla 40 se presentan el factor de condición (FC) y el índice hepato-somático (IHS) de *C. facetum*. Los datos se muestran agrupados por muestreo y por sexo.

En un principio, para cada índice se analizaron las diferencias entre sexos. Tanto el FC como el IHS no presentaron diferencias significativas entre sexos en ninguno de los distintos muestreos ( $p>0,05$ ). De esta forma se pudo calcular un promedio de cada índice para cada muestreo.

Posteriormente se estudiaron las diferencias entre los distintos muestreos para cada índice. Para ello se trabajó con los promedios totales de cada muestreo.

El FC no mostró diferencias significativas entre los distintos muestreos ( $p>0,05$ ). Lo mismo se observó para el IHS ( $p>0,05$ ). Estos resultados posibilitaron calcular un valor promedio total para cada índice.

### **VII. 4. Parámetros hematológicos**

En la tabla 41 se presentan el contenido de hemoglobina (Hb) y el hematocrito (Hct) de *C. facetum*. Los datos se presentan discriminados por muestreo y por sexo.

En primera instancia se analizaron las diferencias entre sexos, para cada muestreo. Tanto el contenido de hemoglobina como el hematocrito no presentaron diferencias significativas entre sexos ( $p>0,05$ ). Por esto se pudo calcular un nivel promedio total para cada muestreo.

Luego se evaluaron las diferencias entre los distintos muestreos trabajando con los promedios totales de cada muestreo.

El contenido de hemoglobina no presentó diferencias significativas entre los muestreos ( $p>0,05$ ); así se pudo calcular un nivel de hemoglobina promedio total.

Tabla 40. Factor de condición e índice hepato-somático ( $\bar{x} \pm DE$ ) de *C. facetum*.

<b>Muestreo</b>		<b>n</b>	<b>FC</b>	<b>IHS</b>
<b>Feb-01</b>	H	3	3,8 ± 0,5	1,2 ± 0,2
	M	4	4,1 ± 0,5	1,6 ± 0,9
	AS	7	4,0 ± 0,5	1,4 ± 0,6
<b>Abr-01</b>	H	3	3,4 ± 0,2	1,8 ± 0,2
	M	7	3,4 ± 0,3	2,1 ± 0,9
	AS	10	3,4 ± 0,3	2,0 ± 0,8
<b>Ago-01</b>	H	4	3,8 ± 0,5	2,1 ± 0,7
	M	3	3,8 ± 0,3	1,6 ± 0,8
	AS	7	3,8 ± 0,4	1,9 ± 0,8
<b>Nov-01</b>	H	3	4,2 ± 0,1	1,5 ± 0,3
	M	3	4,0 ± 0,2	1,5 ± 0,3
	AS	6	4,1 ± 0,2	1,5 ± 0,2
<b>Feb-02</b>	H	8	3,8 ± 0,5	1,2 ± 0,3
	M	7	3,9 ± 0,3	1,4 ± 0,6
	AS	15	3,8 ± 0,4	1,3 ± 0,5
<b>Abr-02</b>	H	3	3,8 ± 0,3	1,9 ± 0,2
	M	3	3,8 ± 0,4	1,8 ± 0,5
	AS	6	3,8 ± 0,3	1,8 ± 0,3
<b>Ago-02</b>	H	3	3,8 ± 0,3	1,5 ± 0,5
	M	3	3,9 ± 0,3	1,4 ± 0,3
	AS	6	3,9 ± 0,3	1,4 ± 0,4
<b>Dic-02</b>	H	3	4,1 ± 0,7	1,0 ± 0,2
	M	3	3,8 ± 0,3	1,1 ± 0,2
	AS	6	3,9 ± 0,5	1,0 ± 0,2
<b>Feb-03</b>	H	3	3,8 ± 0,6	1,7 ± 0,4
	M	3	3,8 ± 0,6	1,9 ± 0,6
	AS	6	3,6 ± 0,2	1,8 ± 0,5
<b>Abr-03</b>	H	3	3,6 ± 0,2	1,5 ± 0,1
	M	3	3,5 ± 0,4	1,5 ± 0,3
	AS	6	3,6 ± 0,2	1,5 ± 0,2
<b>Ago-03</b>	H	3	3,6 ± 0,4	1,7 ± 0,3
	M	3	3,8 ± 0,5	1,6 ± 0,1
	AS	6	3,7 ± 0,3	1,6 ± 0,2
<b>Nov-03</b>	H	3	3,6 ± 0,4	1,5 ± 0,4
	M	3	3,3 ± 0,2	1,6 ± 0,2
	AS	6	3,5 ± 0,3	1,5 ± 0,3
<b>Total</b>	H	<b>42</b>	<b>3,8 ± 0,4</b>	<b>1,5 ± 0,5</b>
	M	<b>45</b>	<b>3,8 ± 0,4</b>	<b>1,6 ± 0,6</b>
	AS	<b>87</b>	<b>3,8 ± 0,4</b>	<b>1,5 ± 0,5</b>

n = número de individuos; H = hembras; M = machos; AS = ambos sexos

Tabla 41. Concentración de hemoglobina y hematocrito ( $x \pm DE$ ) en *C. facetum*.

<b>Muestreo</b>		<b>n</b>	<b>Hb (g dl<sup>-1</sup>)</b>	<b>Hct (%)</b>
<b>Feb-01</b>	H	4	4,9 ± 0,3	26 ± 3
	M	3	4,6 ± 0,4	23 ± 4
	AS	7	4,7 ± 0,4	24 ± 4
<b>Abr-01</b>	H	4	3,6 ± 1,1	21 ± 5
	M	3	4,3 ± 0,4	22 ± 4
	AS	7	4,0 ± 0,8	22 ± 4
<b>Ago-01</b>	H	6	4,7 ± 0,1	24 ± 1
	M	3	4,4 ± 0,2	21 ± 2
	AS	9	4,6 ± 0,2	23 ± 2
<b>Nov-01</b>	H	4	5,0 ± 0,8	27 ± 8
	M	5	5,2 ± 0,2	29 ± 2
	AS	9	5,1 ± 0,5	28 ± 5
<b>Feb-02</b>	H	5	4,9 ± 1,1	25 ± 4
	M	3	4,8 ± 1,9	24 ± 8
	AS	8	4,8 ± 1,5	25 ± 7
<b>Abr-02</b>	H	7	4,1 ± 1,1	22 ± 3
	M	3	4,9 ± 1,2	26 ± 12
	AS	10	4,5 ± 1,1	24 ± 8
<b>Ago-02</b>	H	5	5,0 ± 0,8	21 ± 3
	M	3	4,9 ± 0,5	21 ± 3
	AS	8	4,9 ± 0,6	21 ± 3
<b>Dic-02</b>	H	4	4,7 ± 0,4	22 ± 2
	M	3	3,9 ± 1,3	23 ± 1
	AS	7	4,3 ± 1,0	23 ± 2
<b>Feb-03</b>	H	4	4,7 ± 0,3	24 ± 3
	M	3	5,0 ± 0,4	26 ± 4
	AS	7	4,8 ± 0,3	25 ± 3
<b>Abr-03</b>	H	4	4,4 ± 0,2	21 ± 2
	M	3	4,5 ± 0,4	22 ± 4
	AS	7	4,5 ± 0,3	21 ± 3
<b>Ago-03</b>	H	4	4,6 ± 0,2	23 ± 2
	M	4	4,4 ± 0,3	21 ± 3
	AS	8	4,5 ± 0,2	22 ± 3
<b>Nov-03</b>	H	4	5,0 ± 0,3	27 ± 3
	M	4	5,9 ± 0,3	26 ± 3
	AS	8	5,5 ± 0,6	27 ± 3
<b>Total</b>	H	51	4,7 ± 0,7	24 ± 4
	M	36	4,7 ± 1,0	25 ± 6
	AS	87	4,7 ± 0,9	24 ± 5

n = número de individuos; H = hembras; M = machos; AS = ambos sexos

El hematocrito tampoco presentó diferencias significativas entre los muestreos ( $p > 0,05$ ). Por consiguiente se pudo calcular un valor de hematocrito promedio total.

## VII. 5. Relaciones entre los parámetros estudiados

En la tabla 42 se presentan los coeficientes de correlación de Pearson para todos los parámetros estudiados en este capítulo.

Tabla 42. Coeficientes de correlación de Pearson en *C. facetum*.

	<i>Longitud total</i>	<i>Peso corporal</i>	<i>ALA-D sangre</i>	<i>ALA-D hígado</i>	<i>Hb</i>	<i>Hct</i>	<i>FC</i>	<i>IHS</i>
<i>Longitud total</i>	1,00							
<i>Peso corporal</i>	<b>0,97**</b>	1,00						
<i>ALA-D sangre</i>	-0,01	0,02	1,00					
<i>ALA-D hígado</i>	<b>0,43**</b>	<b>0,38**</b>	-0,02	1,00				
<i>Hb</i>	-0,14	-0,12	-0,10	0,04	1,00			
<i>Hct</i>	0,03	-0,03	<b>-0,49**</b>	0,12	<b>0,53**</b>	1,00		
<i>FC</i>	<b>0,33**</b>	<b>0,44**</b>	<b>0,41**</b>	0,09	0,05	-0,14	1,00	
<i>IHS</i>	0,31	0,29	0,01	-0,02	0,01	-0,11	-0,05	1,00

En negrita correlación significativa \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $P < 0,01$ )

En *C. facetum* la longitud total de los peces presentó un coeficiente de correlación significativo positivo con: el peso corporal, la actividad de la enzima ALA-D en hígado y con el FC. El peso corporal también mostró una correlación significativa positiva con: la actividad de la enzima ALA-D en hígado y con el FC. Por otro lado, la actividad de la enzima en sangre mostró correlaciones significativas positivas con el FC y negativas con el hematocrito. Éste también presentó una correlación significativa positiva con el contenido de hemoglobina.

## VII. 6. Discusión

La caracterización de la enzima ALA-D en sangre e hígado de *C. facetum*, presentó resultados similares a los encontrados en las otras especies de peces estudiadas en este trabajo.

El análisis de la variabilidad natural de la enzima ALA-D en *C. facetum* corrobora lo encontrado en *P. lineatus*, la actividad de la misma no se modifica con la época del año así como tampoco presenta diferencias entre sexos. Por otro lado, en esta especie, la actividad reactivada no presentó diferencias con la no reactivada, por lo que se consideró que la actividad no reactivada representa a la actividad basal máxima. Esto se corresponde con el hecho de que estos peces proceden de un estanque en el cual no se ha detectado plomo, por lo tanto no existe exposición de los mismos a este metal.

Con respecto a la enzima hepática los resultados obtenidos resultaron similares a los de la enzima sanguínea y a la hepática de las otras especies estudiadas.

El estudio de la variabilidad en la actividad basal de la enzima ALA-D en ambos tejidos de *C. facetum* mostraron que la misma no se encuentra influida por factores tales como temperatura del agua, sexo de los individuos o estado reproductivo. Así la variabilidad observada se debe meramente a variaciones intraspecíficas.

En relación a los índices morfométricos y a los parámetros hematológicos tampoco presentaron variaciones ni con la época del año ni con el sexo.

El análisis de las relaciones entre las variables estudiadas mostró una correlación positiva entre la actividad de la enzima ALA-D en hígado y la edad de los peces. Este es un aspecto importante ya que en las otras especies estudiadas no se encontraron relaciones significativas entre la actividad de la enzima hepática y la edad de los peces. Este hecho podría explicarse en parte por la diferente función que cumple el hemo sintetizado en tejido hepático, el cual es usado en su mayor parte como grupo prostético de los citocromos, especialmente el P-450, el cual actúa induciendo la síntesis hepática del hemo cuando su propia síntesis se encuentra estimulada. El citocromo P-450 es afectado por varios factores fisiológicos y ambientales, tales como el estado reproductivo, los niveles de esteroides sexuales, temperatura y exposición a ciertos xenobióticos. Las variaciones en el cyp P-450 podrían entonces afectar la actividad del ALA-D hepática. Así en poblaciones no expuestas a una importante carga de xenobióticos, tales como la de *C. facetum*, las

variaciones en la actividad de ALA-D hepática muestran una relación con la edad de los peces. La situación en las poblaciones de peces del estuario del río de la Plata es diferente ya que la relación entre la actividad de ALA-D hepática y la edad de los peces se encontraría enmascarada por la presencia en el ambiente de múltiples xenobióticos que influyen sobre la concentración del cyp P-450 en el organismo.

## VIII. Actividad de la enzima ALA-D en *C. facetum*. Estudios de laboratorio

Una vez determinado que la actividad de la enzima ALA-D en *C. facetum* se encontraba en su estado basal se procedió a realizar ensayos de exposición a plomo. En este capítulo se presentan los resultados obtenidos mediante estudios de exposición a plomo  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  (concentración nominal) realizados en condiciones de laboratorio durante 17 días con *C. facetum*. El objetivo de estos ensayos fue analizar el grado de respuesta de la enzima ALA-D en peces no expuestos previamente a plomo.

En primer lugar se estudiaron los distintos parámetros analizados en relación al sexo de los peces. No se encontraron diferencias por sexo en ninguno de los parámetros estudiados ( $p > 0,05$ ). Esto permitió trabajar con la totalidad de los datos, sin necesidad de discriminar entre hembras y machos.

### VIII. 1. Reactivación de la actividad de la enzima ALA-D mediante el empleo de $\text{Zn}^{2+}$

El efecto de la concentración de  $\text{Zn}^{2+}$  sobre la actividad de la enzima se evaluó considerando las actividades porcentuales respecto del máximo valor observado. En la Fig. 81 se presentan los resultados obtenidos.

La actividad de la enzima ALA-D varió en función de la concentración de  $\text{Zn}^{2+}$ , presentando actividades máximas en concentraciones de 10 a  $30 \mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  ( $p < 0,05$ ). Por consiguiente para reactivar la actividad de la enzima se usó una concentración final de  $15 \mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$ .

### VIII. 2. Niveles de actividad y %I de la enzima ALA-D en muestras de sangre

En la Fig. 82 se presentan los niveles promedio de actividad no reactivada (ALA-D) y reactivada con  $15 \mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  (ALA-D<sub>R</sub>) de la enzima ALA-D correspondientes a los individuos control y expuestos en condiciones de laboratorio.

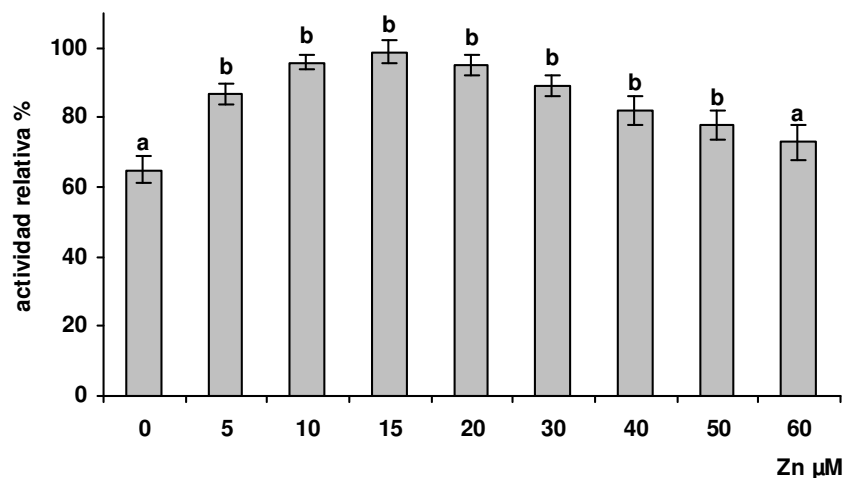


Fig. 81. Actividad relativa de la enzima ALA-D en función de la concentración de  $\text{Zn}^{2+}$  en *C. facetum* expuestos a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de Pb. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas con respecto al control (sin  $\text{Zn}^{2+}$ ;  $p < 0,05$ ).

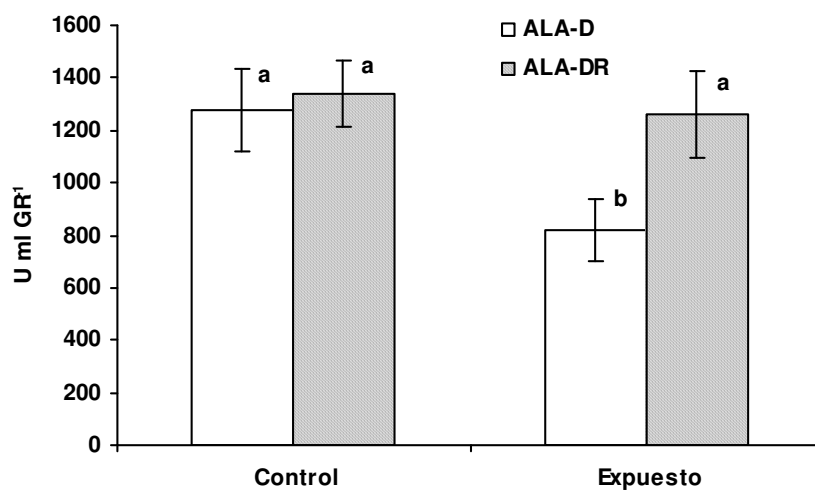


Fig. 82. Actividad no reactivada (ALA-D) y reactivada (ALA-DR) de la enzima ALA-D en  $\text{U ml GR}^{-1}$  en *C. facetum*. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En los peces expuestos se registró menor actividad ( $p < 0,05$ ). En cuanto a la actividad de ALA-DR, no se registraron diferencias significativas entre los peces controles y expuestos ( $p > 0,05$ ).

Por otro lado, en peces controles no se observaron diferencias entre la actividad de ALA-D y ALA-D<sub>R</sub> ( $p>0,05$ ), mientras que en los expuestos la actividad de ALA-D resultó menor que la reactivada ( $p<0,05$ ). Por esto, sólo se calculó el %I para los peces expuestos el cual resultó igual a  $35 \pm 4 \%$ .

### VIII. 3. Niveles de actividad de la enzima ALA-D en muestras de tejido hepático

En la Fig. 83 se presentan las actividades promedio del ALA-D hepática en *C. facetum* correspondientes a individuos control y expuestos. Se analizaron las diferencias en la actividad de la enzima ALA-D entre los controles y expuestos. No se observaron diferencias significativas entre ellos ( $p>0,05$ ).

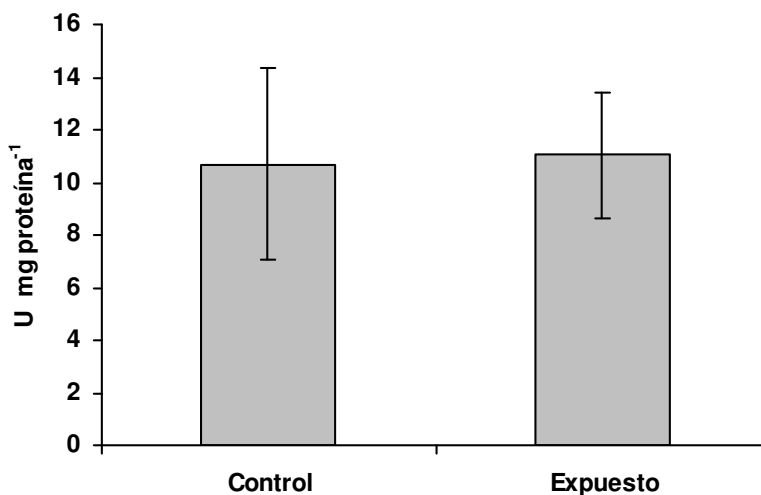


Fig. 83. Actividad específica en U mg proteína<sup>-1</sup> de la enzima ALA-D en muestras de hígado de *C. facetum*.

### VIII. 4. Niveles de plomo en muestras de organismos enteros

En la Fig. 84 se presentan los niveles de plomo determinadas en organismos enteros controles y expuestos.

Los niveles de plomo registrados en organismos enteros variaron entre 2,0 a 2,8  $\mu\text{g g}^{-1}$ , en peces controles y entre 2,3 a 3,7  $\mu\text{g g}^{-1}$  en peces expuestos. Los niveles de plomo presentaron una distribución significativamente diferente entre peces controles y expuestos ( $p<0,05$ ).

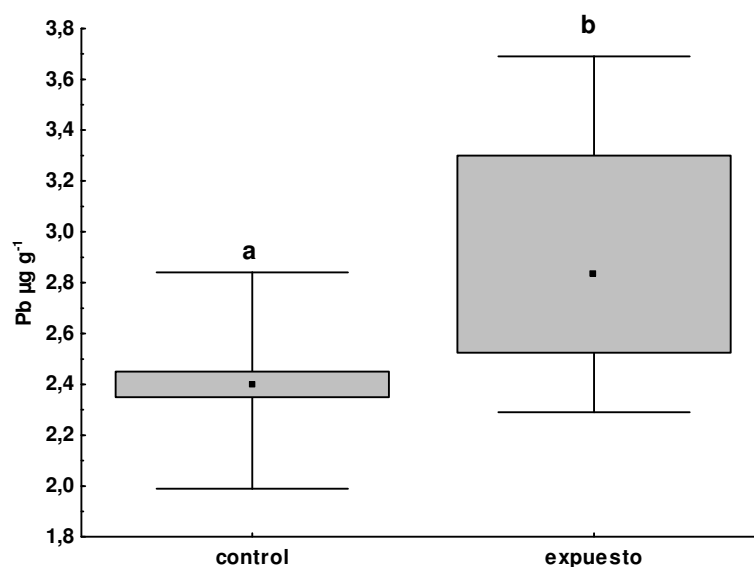


Fig. 84. Niveles de plomo en muestras de organismos enteros en *C. facetum*. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### VIII. 5. Parámetros hematológicos

En la Tabla 43 se presentan los niveles de hemoglobina y hematocrito de *C. facetum* en peces controles y expuestos.

Tabla 43. Concentración de hemoglobina (Hb) en  $g\ dl^{-1}$  y hematocrito (Hct) en % ( $x \pm DE$ ) de *C. facetum*.

	Hb ( $g\ dl^{-1}$ )	Hct (%)
<b>Control</b>	$4,6 \pm 2,0$	$26 \pm 7$
<b>Expuesto</b>	$4,9 \pm 0,7$	$28 \pm 5$

No se observaron diferencias significativas entre peces controles y expuestos en ninguno de los dos parámetros hematológicos ( $p > 0,05$ ).

### VIII. 6. Índices morfométricos

En la Tabla 44 se presentan el factor de condición y el índice hepato-somático para *C. facetum*. No se observaron diferencias significativas entre peces controles y expuestos para ninguno de los índices morfométricos ( $p > 0,05$ ).

Tabla 44. FC e IHS ( $x \pm DE$ ) de *C. facetum*.

	<b>FC</b>	<b>IHS</b>
<b>Control</b>	3,8 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 0,6
<b>Expuesto</b>	4,0 $\pm$ 0,6	3,7 $\pm$ 0,4

## VIII. 7. Discusión

Los estudios mediante los ensayos de exposición presentaron algunos aspectos importantes:

a) Los resultados obtenidos con el uso de  $Zn^{2+}$  confirman lo registrado en las otras especies de peces tanto en la dependencia de la enzima sanguínea en relación al  $Zn^{2+}$  como en la concentración requerida para la máxima reactivación.

b) En muestras de sangre el efecto de una exposición subcrónica a plomo se evidencia por la menor actividad de la enzima en los peces expuestos con respecto a los controles y también con respecto a la actividad reactivada en los peces expuestos. La existencia de inhibición en la actividad de la enzima de peces expuestos se corresponde con los mayores niveles de plomo registrados en estos individuos.

c) Con respecto a la actividad de la enzima en muestras de tejido hepático no se observaron diferencias entre organismos controles y expuestos. Este hecho corrobora los resultados obtenidos con *P. lineatus*, la actividad de la enzima hepática no constituye un biomarcador de plomo, ni siquiera en estudios de laboratorio

d) Los parámetros hematológicos no presentaron diferencias entre peces controles y expuestos. Así, una inhibición de la enzima ALA-D de 35 % no modifica los parámetros hematológicos en esta especie.

e) Los índices morfométricos no mostraron diferencias entre peces controles y expuestos. Estos resultados demuestran que la exposición a plomo no modifica el peso corporal de los peces, al menos durante el período de estudio.

# CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se derivan del presente trabajo se resumen a continuación: El ALA-D presente en sangre e hígado de todas las especies de peces estudiadas son isoenzimas. Las principales diferencias se evidencian en la constante de afinidad ( $K_m$ ) y en la dependencia de su actividad en relación al  $Zn^{2+}$ . La actividad determinada en muestras de sangre presentó una alta variabilidad, independientemente del grado de contaminación al que estuvieran expuestos los peces. En algunos casos la enzima mostró diferencias significativas entre los períodos de muestreo. Sin embargo, estas diferencias no presentaron ningún patrón estacional. Por el contrario, la actividad de las enzimas hepáticas presentes en cada especie mostró menor variabilidad sin presentar diferencias entre los períodos de muestreo.

Usualmente se observa una alta variabilidad cuando se estudian las respuestas de parámetros biomarcadores en animales recolectados en ambientes naturales. Existe un gran número de factores que condicionan dicha variabilidad, tales como el sexo, la edad, el estado nutricional y la época del año, los cuales pueden afectar la respuesta de cualquier parámetro biomarcador. No obstante, estos factores no fueron los principales responsables de las variaciones observadas en la actividad de ALA-D. Es posible asumir que además de la heterogeneidad genética, la presencia de plomo, puede explicar en gran medida la variabilidad intraespecífica encontrada.

Cuando se analizó la dependencia de la actividad de la enzima en *P. lineatus* de Berazategui en relación a los niveles de plomo registrados en las muestras de sangre, hígado y branquias de los peces; únicamente en las muestras de sangre la actividad de ALA-D mostró una baja correlación con los niveles de plomo. Pero aún así un bajo nivel de actividad enzimática no necesariamente podía ser atribuido a una inhibición dependiente de plomo.

Los estudios de laboratorio contribuyeron en gran medida a la interpretación de los resultados. Primero, porque se pudo observar que sólo la enzima sanguínea podía ser aún más inhibida como consecuencia de una exposición adicional al plomo, con un incremento paralelo en los niveles de este metal en el pez. Además nos mostró que una vez inhibida la enzima no recupera su nivel de actividad inicial ni

siquiera cuando los organismos se depuran en agua decontaminada, por lo menos en el período de tiempo estudiado. La comprobación de una inhibición dependiente de plomo nos aportó el material necesario para poder desarrollar la técnica de reactivación. Se obtuvieron resultados positivos sólo en muestras de sangre y mediante el empleo de  $Zn^{2+}$ . De esta forma se pudo calcular un porcentaje de inhibición enzimática, el cual mostró una muy buena correlación con el nivel de plomo en sangre.

Los estudios realizados en las distintas zonas del río de la Plata mostraron diferencias entre las especies bentónicas (*P. lineatus* y *C. carpio*) y la pelágica (*L. obtusidens*). En las especies bentónicas procedentes de las zonas cercanas a descargas cloacales (Berazategui y Berisso) se registró una inhibición de ALA-D sanguínea, mientras que en aquellas procedentes de zonas no influenciadas por descargas cloacales (Atalaya y Corrientes) no se registró inhibición. Por otro lado la enzima ALA-D de *L. obtusidens* no presentó inhibición en ninguna de las zonas estudiadas. Estos resultados aportan dos conclusiones importantes, por un lado que las descargas cloacales son importantes fuentes de emisión de plomo a los ambientes acuáticos. Por otro lado que las especies bentónicas constituyen los componentes del ecosistema más seriamente afectados en los ambientes acuáticos contaminados por plomo.

Si bien el ALA-D es una enzima que forma parte de la vía sintética del grupo hemo, su inhibición no afecta a los parámetros hematológicos. Los índices morfométricos tampoco se vieron afectados.

Dos conclusiones relevantes se pueden extraer del presente trabajo. Desde un punto de vista bioquímico, los resultados obtenidos en estudios de campo y de laboratorio confirman que el ALA-D sanguínea y hepática son isoenzimas. La enzima hepática no es susceptible de ser fácilmente inhibida por plomo, al menos en relación a los niveles registrados de este metal en las muestras estudiadas. Niveles similares de actividad se registraron en los peces recolectados en las distintas zonas del río de la Plata, mientras que los niveles de plomo resultaron significativamente diferentes. Los menores valores de  $K_m$  y la ausencia de respuesta frente al zinc

registrados en la enzima hepática refuerzan la existencia de diferencias estructurales entre el ALA-D sanguínea y hepática.

Desde un punto de vista ambiental o de evaluación de riesgo, el uso de la reactivación de ALA-D constituye un mejor biomarcador de exposición a plomo que la clásica determinación de su actividad. Una de las principales ventajas que provee es que el mismo individuo constituye el control de referencia, por lo que se hace innecesario muestrear en zonas de referencia que puedan considerarse libres de contaminación y que en muchos casos resultan prácticamente imposibles de identificar.

# **BIBLIOGRAFÍA CITADA**

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- AA-AGOSBA-ILPLA-SHN (Aguas Argentinas- Administración General de Obras Sanitarias de la Provincia de Buenos Aires- Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet"- Servicio de Hidrografía Naval de la Armada Argentina), 1997.** Calidad de las aguas de la franja costera sur del Río de la Plata (San Fernando-Magdalena).
- AGOSBA-OSN-SIHN (Administración General de Obras Sanitarias de la Provincia de Buenos Aires- Obras Sanitarias de la Nación- Servicio de Hidrografía Naval de la Armada Argentina), 1992.** Río de la Plata. Calidad de las aguas. Franja Costera Sur (San Isidro-Magdalena). Informe de Avance. 53 pp.
- Agostinho A.A.; Vazzoler A.E. y Thomaz S.M., 1995.** The High River Paraná Basin: Limnological and Ichthyological Aspects. En: Tundisi J.G.; Bicudo C.E. y Tundisi Matsumura. T. (Editores.), *Limnology in Brasil*. Rio de Janeiro, pp. 57–103.
- Abbt-Braun G., Frimmel F.H. y Shulten H.R., 1989.** Structural investigations of aquatic humic substances by pyrolysis-field ionization mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Water Research* 23, 1579-1591.
- Abdulla M., Svensson S., Haeger-Aronsen B., Mathur A. y Wallwnius K., 1978.** Effect of age and diet on delta-aminolevulinic acid dehydratase in red blood cells. *Enzyme* 23, 170-175.
- Aisemberg J., Nahabedian D. E., Wider E. A. y Verrengia Guerrero N. R., 2005.** Comparative study on two freshwater invertebrates for monitoring environmental lead exposure. *Toxicology* 210, 45-53.
- Aizpún de Moreno J. E., Moreno V. J., Gerpe M. S., Miglioranza K. S. B., Gonzalez M. y Ondarza P., 2003.** Plaguicidas organoclorados y metales pesados en la biota del Río de La Plata y su Frente marítimo. Primer informe de avance. Proyecto PNUD/GEF/RLA/99/G31 [www.freplata.org/](http://www.freplata.org/) documentos.
- Alexander M., 1980.** Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* 211, 132-138.
- Almeida J. S., Meletti P. y Martinez C. B. R., 2005.** Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 140, 356-363.
- Almirón A. E., Gómez S. E. y Toresani N. I., 1992.** Peces de agua dulce de la provincia de Buenos Aires, Argentina. CIC. Situación ambiental de la Pcia. de Buenos Aires. Recursos y rasgos naturales en la evaluación ambiental. Año 2 nº 12, 1-29.

- Alves Costa J. R. M., Mela M., da Silva de Assis H. C., Pelletier E., Ferreira Randi M. A. y de Oliveira Ribeiro C. A., 2007.** Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 82–88.
- APHA-AWWA-WPCF, 1980.** American Public Health Associations, American Water Works Associations and Water Pollution Control Federation. Standards methods for the examination of water and wastewater, Quinceava edición.
- Ashton A. y Chan R, 1987.** Monitoring of microgram per litre concentrations of trace metals in sea water: the choice of methodology for sampling and analysis. *Analyst* 112, 841-844.
- Bagenal T. B. y Tesch F. W., 1978.** Methods for assessment of fish production in fresh water. En: Bagenal TB (Ed.), Age and Growth (pp. 101-136). Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Baigún C.R.M., Sverlij S.B y López H.L., 2003.** Recursos pesqueros y pesquerías del Río de la Plata interior y medio (margen argentino). Informe final FREPLATA PNUD/GEF/RLA/99/G31, [www.freplata.org/](http://www.freplata.org/) documentos
- Balon E.K., 1995.** Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from roman gourmets to the swimming flowers. *Aquaculture* 129, 3-48.
- Batlle A.M. del C. y Magnin P.H., 1988.** Porfirias y porfirinas. Aspectos clínicos y bioquímicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana Superior* 2, 109 pp.
- Battistuzzi G., Petrucci R., Silvagni L., Urbani F.R. y Caiola S., 1981.** δ-aminolevulinatase dehidratasa: un nuevo polimorfismo genético en el hombre. *Annales of Human Genetic* 45, 223-229.
- Baudo R. y Muntau H., 1990.** En: Sediments: Chemistry and toxicity of in-place pollutants. R. Baudo, J.P. Giesy y H. Muntau, editores. Lewis Publishers, Inc. pp. 1-14.
- Bayley P.B., 1973.** Studies on the migratory characin, *Prochilodus platensis* Holmberg, 1889 (Pisces, Characoidei), in the river Pilcomayo, South America. *Journal of Fish Biology* 5, 25-40.
- Bazán J.M. y Arraga E., 1993.** En: Conferencias de Limnología; A. Boltovskoy y H.L. López, editores. Instituto de Limnología Dr. R. A. Ringuelet. La Plata, pp. 71-82.
- Bechara J.; Sánchez S.; Roux J.; Terraes J. y Flores Quintana, C., 1999.** Variaciones del factor de condición relativo de la ictiofauna del río Paraná aguas debajo de la represa de Yacyretá. Argentina. *Revista de Ictiología* 7, 75–89, special issue.
- Beeby A., 1991.** En: Metal ecotoxicology: Concepts & applications; M.C. Newman y A.W. McIntosh (Editores). Lewis Publishers, Inc. pp. 65-90.

- Bergdahl I., 1997.** Lead in blood. ICP-MS studies of lead in plasma, blood and erythrocyte proteins. Tesis doctoral, Universidad de Lund, Suiza, 118 pp.
- Bergdahl I. A., Grubb A., Schütz A., Desnick R.J., Wetmur J.G., Sassa S. y Skerfving S., 1997.** Lead binding to [delta]- aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocytes. *Pharmacology and Toxicology* 81, 153-158.
- Bergdahl I. A., Sheveleva M., Schütz A., Artamonova V. G. y Skerfving S., 1998.** Plasma and blood lead in humans: capacity-limited binding to  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase and other lead-binding components. *Toxicological Sciences* 46, 247-253.
- Berisha B., Bakalli R., Stekar M.A., Rozhaja D. y Demaj A., 1994.** The influence of lead on some physiological parameters in hens. *Zb. Biotehniške fak., Univ. v Ljubljani, Kmetijstvo (Zootehnika)* 64, 111-119.
- Berlín A. y Schaller K.H., 1974.** European standardized method for the determination of delta-aminolevulinic acid dehydrase activity in blood. *Zeitschrift Klinische Biochemie* 12, 389-390.
- Björkman L., Vater M. y Pedersen N.L., 2000.** Both the environment and genes are important for concentrations of cadmium and lead in blood. *Environmental Health Perspectives* 108 (8), 719-722.
- Blus L.J., Henny C.J., Hoffman D.J. y Grove R.A., 1991.** Lead toxicosis in tundra swans near a mining and smelting complex in Northern Idaho. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 21, 549-555.
- Blus L.J., Henny C.J., Hoffman D.J. y Grove R.A., 1993.** Accumulation and effects of lead and cadmium on wood ducks near a mining and smelting complex in Northern Idaho. *Ecotoxicology* 2, 139-154.
- Blus L.J., Henny C.J., Hoffman D.J. y Grove R.A., 1995.** Accumulation in and effects on waterfowl and passerines in Northern Idaho. *Environmental Pollution* 89, 311-318.
- Blus L.J., Henny C.J., Hoffman D.J., Sileo, L. y Audet, D.J., 1999.** Persistence of high lead concentrations and associated effects in tundra swans captured near a mining and smelting complex in Northern Idaho. *Ecotoxicology* 8, 125-132.
- Bodek I., Lyman W.J. Reehl W.F. y Rosenblatt D.H., eds., 1988.** Environmental inorganic chemistry properties, processes, and estimation methods. Pergamon Press, pp. 781-789.
- Bonetto A.A. y Pignalberi C., 1964.** Nuevos aportes al conocimiento de las migraciones de peces en los ríos mesopotámicos de la República Argentina. *Comun. INALI* 1, 1-15.

- Bonetto A.A.; Cordiviola de Yuan E.; Pignalberi C. y Oliveros O., 1969.** Ciclos hidrológicos del río Paraná y las poblaciones de peces contenidas en las cuencas temporarias de su valle de inundación. *Physis* 29, 213–223.
- Bonetto A.A.; Cordiviola de Yuan E. y Pignalberi C., 1970.** Nuevos datos sobre poblaciones de peces en ambientes leníticos permanentes del Paraná Medio. *Physis* 30, 141–154.
- Bonetto A.A., Pignalberi C., Cordiviola De Yuan E. y Oliveros O., 1971.** Informaciones complementarias sobre migraciones de peces de la cuenca del Plata. *Physis* 30, 505-520.
- Bonetto, A.A., 1976.** Calidad de las aguas del río Paraná. Introducción a su estudio ecológico. Dir. Nac. Constr. Portuarias Vías Navegables, INCYTH, PNUD, Of. Coop. Téc. ONU, 202 pp.
- Bonetto A. A., Canon Veron M. y Roldán D., 1981.** Nuevos aportes al conocimiento de las migraciones de peces del río Paraná. *Ecosur* 8, 29-40.
- Bonetto C.A., Bonetto A.A. y Zalocar Y., 1981.** Contribución al conocimiento limnológico del río Paraguay en su tramo inferior. *Ecosur* 8, 55-88.
- Bonsignore D., Calissano P. y Cartasegna C., 1965.** Un semplice metodo per la determinazione della  $\delta$ -amino-levulinico-dehidratasi nel sangue. *Medicina del Lavoro* 36 (3), 199-205.
- Bradford W.L. y Horowitz A.J., 1988.** (Editores). En: The role of sediments in the chemistry of aquatic systems. US Geological Survey, Circular 969, 75 p.
- Braga L., 1993.** Los Anostomidae (Pisces Characiformes) de Argentina. *FAUNA de agua dulce de la Argentina* 40, 31-33.
- Brezonik P.L., King S.O. y Mach C.E., 1991.** En: Metal ecotoxicology: Concepts & applications; M.C. Newman y A.W. McIntosh (Editores). Lewis Publishers, Inc. pp. 1-32.
- Briscoe J., 1993.** When the cup is half full: Improving water and sanitation services in the developing world". *Environment* 35 (4), 7-37.
- Brock V. y Brock A., 1993.** Increased 5-aminolevulinic acid (ALA) in heavy metal exposed bivalve molluscs, *Cerastoderma edule*: an effect due to inhibition of porphobilinogen synthase? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 105, 493-499.
- Brown V.M, Shaw T.L. y Shurben D.G., 1974.** Aspects of water quality and the toxicity of copper to rainbow trout. *Water Research* 8, 797-803.
- Burch H. B. y Siegel A. L., 1971.** Improved method for measurement of delta-aminolevulinic acid dehydratase activity of human erythrocytes. *Clinical Chemistry* 17, 1038-1041.
- Bulus, G.D.; Rossini A. y Ronco A., 2004.** Sensitivity of *Cichlasoma facetum* (Cichlidae, Pisces) to Metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 72, 763–768.

- Camargo M.M.P. y Martinez C.B.R., 2006.** Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ test in an urban stream in southern Brazil. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21, 61-69.
- Campana O., Sarasquete C. y Blasco J., 2003.** Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipids peroxidation in blood, kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55, 116-125.
- Campbell, K.R., 1994.** Concentrations of heavy metals associated with urban runoff in fish living In stormwater treatment ponds. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27, 352-356.
- CARP (Comisión Administradora del Río de la Plata), 1989.** Estudio para la evaluación de la contaminación en el Río de la Plata. SHIN-SOHMA, 422 p.
- Carsen, A., 2003.** Aportes de contaminantes y sedimentos al río de la plata interior franja costera: calidad de agua, sedimentos y presencia de contaminantes en biota. Primer Borrador. FREPLATA PNUD/GEF/RLA/99/G31, [www.freplata.org / documentos](http://www.freplata.org/documentos)
- Christensen G. M., Hunt E. y Fiandt J., 1977.** The effect of methylmercuric chloride, cadmiun chloride and lead nitrate on six biochemical factors of the brok trout (*Salvenilus fontinalis*). *Toxicology Applied Pharmacology* 59, 268-278.
- Colautti D.C., 1997.** Ecología de la carpa *Cyprinus carpio* en la cuenca del Río Salado, provincia de Buenos Aires. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. 215 pp.
- Colombo, J. C., Bilos C., Remes Lenicov M., Colautti D., Landoni P. y Brochu C., 2000.** Detritivorous fish contamination in the río de la Plata estuary. A critical accumulation pathway in the cycle of antropogenic compounds. *Canadian Journal of Fisheries & aquatic Sciences* 57, 1139-1150.
- Colombo J. C., Cappelletti N., Migoya M. C. y Speranza E., 2007 a.** Bioaccumulation of anthropogenic contaminants by detritivorous fish in the Rio de la Plata estuary: 1-Aliphatic hydrocarbons. *Chemosphere* 68, 2128-2135.
- Colombo J. C., Cappelletti N., Migoya M. C. y Speranza E., 2007 b.** Bioaccumulation of anthropogenic contaminants by detritivorous fish in the Rio de la Plata estuary: 2-Polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 69, 1253-1260.
- Conner E.A. y Fowler B.A., 1994.** Biochemical and inmunological properties of hepatic delta-aminolevulinic acid dehidratase in channel catfish (*Ictalurus-punctatus*). *Aquatic toxicology* 28 (1-2): 37-52.
- Dagnino Pastore L., 1973.** Capítulo 4: Física. En: Mi Galaxia (volumen 2). Ed. Nobis, Argentina, pp. 1-122.

- Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A. y Colombo R., 2003.** Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329, 23-38.
- Delfino R. y Baigún C., 1985.** Marcaciones de peces en el embalse de Salto Grande, río Uruguay (Argentina-Uruguay). *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral* 16, 85-93.
- Depledge M.H., 1989.** The rational basis for detection of the early effects of marine pollutants using physiological indicators. *Ambio* 18, 301-302.
- Dissanayake A., Galloway T.S. y Jones M.B., 2008)** Nutritional status of *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda) influences susceptibility to contaminant exposure. *Aquatic Toxicology* 89, 40-46.
- Doyle D. y Schimke R.T., 1969.** The genetic and developmental regulation and hepatic  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase in mice. *Journal Biology Chemical* 244, 5.449-5.459.
- Dresel E.I.B. y Falk J.E., 1953.** Conversión of delta-aminolevulinate to porphobilinogen in a tissue system. *Nature* 172, 1.185-1.187.
- Duce R. A., Stumm W. y Prospero J.M., 1972.** Working symposium on sea-air chemistry: Summary and Recommendations. *Journal of Geophysical Research* 77, 5059-5061.
- Dwyer F.J., Schmitt C.J., Finger S.E. y Mehrle P.M., 1988.** Biochemical changes in longear sunfish, *Lepomis megalotis*, associated with lead, cadmium and zinc from mine tailings. *Journal of Fish Biology* 33, 307-317.
- Eaton D.L. y Klaassen C.D., 2001. Principles of toxicology.** En: Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. M.O. Andur, J. Doull y C.D. Klaassen, (Editores). New York , Mclaw-Hill, quinta edición; pp. 11-34.
- Erskine P.T., Senior N., Awan S., Lambert R., Lewis G., Tickle I.J., Sarwar M., Spencer P., Thomas P., Warren M.J., Shoolingin-Jordan P.M., Wood S.P. y Cooper J.B., 1997.** *Nature and Structural Biology* 4, 1025–1031.
- Fabiano G., Amestoy F., García C. y Ares L., 1992.** Estudio de las variaciones en la abundancia, la estructura y la distribución espacio-temporal de los efectivos de carpa común, *Cyprinus carpio*, en el río de la Plata medio e interior y en el río Uruguay inferior. Publicaciones de la Comisión Administradora del Río Uruguay. *Serie Técnico-Científica* 1, 13- 24.
- Farina M., Brandao R., Lara F. S., Soares F.A.A., Souza D.O. y Rocha J.B.T., 2003.** Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase from mouse liver, kidney and brain. *Toxicology Letters* 139, 55-66.

- Finelli V.N., Murthy L., Peirano W.B. y Petering H.G., 1974.**  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase, a zinc dependent enzyme. *Biochemical and Biophysical Research communications*. 60 (4), 1.418-1.424.
- Florence T.M., Morrison G.M. y Stauber J.L., 1992.** Determination of trace element speciation and the role of speciation in aquatic toxicity. *Science of Total Environment* 125, 1-13.
- Ford J., 1989.** En: *Ecotoxicology: Problems and approaches*. S. A. Levin, M.A. Harwell, J.R. Kelly y K.D. Kimball, (Editores) Springer-Verlag, New York Inc.; pp. 99-144.
- Förstner U., 1990.** En: *Sediments: chemistry and toxicity of in place pollutants*. R. Baudo, J.P. Giesy y H. Muntau, editores. Lewis Publishers Inc.; pp. 61-105.
- Franja Costera Sur (FCS), 1997.** Calidad de la aguas de la franja costera sur del río de la Plata (San Fernando- Magdalena). Ed. Consejo Permanente para el Monitoreo de la Calidad de las Aguas de la Franja Costera Sur del Río de la Plata.
- Frenet M., 1981.** The distribution of mercury, cadmium and lead between water and suspended matter in the Loire Estuary as a function of the hydrological regime. *Water Research* 15, 1343-1350.
- Frías F.C. y Janiot L., 2000.** Protección ambiental costera y desarrollo sustentable en el río de la Plata frente a las actividades basadas en tierra. UCES. Fundación Maphre.
- FUEM. NUPELIA/ITAIPÚ Binacional, 1987.** Ictiofauna e biología pesqueira. Relatório do Projeto. Fundação Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 640 pp.
- Fujita H., Orii Y. y Sano S., 1981.** Evidence of increased synthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase in experimental lead-poisoned rats. *Biochimica et Biophysica Acta* 678, 39-50.
- Fujita H., Sato K. y Sano S., 1982.** Increase in the amount of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase in workers with moderate lead exposure. *International Archives of Occupational Environmental and Health*. 50, 287-297.
- García-Delgado M., Rodríguez-Cruz M. S., Lorenzo L. F., Arienzo M. y Sánchez-Martín M. J. 2007.** Seasonal and time variability of heavy metal content and its chemical forms in sewage sludges from different wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment* 382, 82-92.
- GESAMP, 1984.** Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution. Review of potentially harmful substances: cadmium, lead, and tin. World Health Organization. Reports and Studies 22, 114p.

- GESAMP, 1987.** Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution. Land/Sea boundary flux of contaminants: contribution from river. World Health Organization. Reports and Studies 32, 171 p.
- GESAMP, 1991.** Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution. Statement of the Intergovernmental Meeting of Experts on Land Based Sources of marine Pollution. World Health Organization.
- Gibson R.D., Neuberger A. y Scott J.J., 1955.** The purification and properties of  $\delta$ -aminolaevulinic acid dehydrase. *Biochemical Journal* 61, 618-629.
- Giesy J.P.Jr. y Hoke R.A., 1990.** En: Sediments: chemistry and toxicity of in-place pollutants. R. Baudo, J.P. Giesy y H. Muntau, (Editores) Lewis Publishers, Inc. pp. 265-348.
- Gioda C.R., Lissner L.A., Preto A., da Rocha J.T.B., Schetinger M.R.C., Neto J.R., Morsch V.M. y Loro, V.L., 2007.** Exposure to sublethal concentrations of Zn(II) and Cu(II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. *Chemosphere* 69, 170-175.
- Godoy M.P. de, 1975.** Peixes do Brasil, Suborden Characoidei. Bacia do Rio Mogi Guassú, Vol. IV/VIII, 629-847. Ed. Franciscana, Piracicaba, S. P.
- Godwin H.A., 2001.** The biological chemistry of lead. *Current Opinion in Chemical Biology* 5, 223-227.
- Goede R. W. y Burton B. A., 1990.** Organismic indices and autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. En: S. Marshal Adams (Ed.), Biological Indicator of Stress in Fish (First edition, pp. 93-108). Maryland, USA: American Fisheries Society.
- Goering P.L., Mistry P. y Fowler B.A., 1986.** A low molecular weight lead binding protein in brain attenuates lead inhibition of aminolevulinic acid dehidratase: composition with a renal lead binding protein. *Journal of Pharmacol Experiment Ther* 237, 220-225.
- Goering P.L., 1993.** Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. *Neurotoxicology* 14, 45-60.
- González O., Fernández J. y Martín M., 1987.** Inhibition of trout (*Salmo gairdneri* R.) PBG-synthase by some metals ions ( $Mg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 86, 163-167.
- Goulart E. C., Pereira C. A. T., García R. C., Giacomelli M. B. O. y Rodríguez A. L. S., 2001.** Effects of lead and/or zinc exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinat dehydratase and negative geotaxis of suckling rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34, 785-790.

- Goyer R.A. y Clarkson T.W., 2001.** Toxic effects of metals. En: Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. M.O. Andur, J. Doull y C.D. Klaassen, (Editores) New York : Mclaw-Hill, sexta edición; pp. 811-868.
- Granick S., 1954.** Enzymatic conversion of delta-aminolevulinic acid to porphobilinogen. *Science* 120, 1.105-1.107.
- Granick S., Sassa S., Granick J. L., Levere R. D. y Kappas A., 1972.** Assays for porphyrins,  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase, and porphyrin synthetase in microliter samples of whole blood: applications to metabolic defects involving the heme pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America* 69, 2381-2385.
- Granick S., Sassa S., Granick J. L., Levere R. D. y Kappas A., 1973.** Studies in lead poisoning, II Correlation between the ratio of activated to inactivated  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase of whole blood and the blood lead level. *Biochemical Medicine* 8, 149-159.
- Gregus Z. y Klaassen C.D., 2001. Mechanims of toxicology.** En: Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. M.O. Andur, J. Doull y C.D. Klaassen, (Editores) New York, Mclaw-Hill, quinta edición; pp. 35-82.
- Gurer-Orhan H., Sabir H.U. y Özgüneş H., 2004.** Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology* 195, 147-154.
- Hæger-Aronsens B, 1960.** Studies on urinary excretion of  $\delta$ -aminolaevulinic acid and others haem precursors in lead workers and lead-intoxicated rabbits. malmø General Hospital, University of Lund, Malmö, Sweden. Oslo, 128 pp.
- Hahn N.S.; Agostinho A.A.; Gomes L.C. y Bini L., 1998.** Estructura trófica da icitiofauna do reservatório de Itaipú (Paraná-Brasil) nos primeiros anos de sua formação. *Interciencia* 23, 299–305.
- Handy R.D. y Eddy F.B., 1990.** The interactions between the surface of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and waterborne metal toxicants. *Functional Ecology* 4: 385-392.
- Haux C. y Larsson Á., 1982.** Influence of inorganic lead on the biochemical blood composition in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 6, 28-34.
- Heath, A.G., 1995.** Water pollution and fish physiology. Lewis Publishers. Segunda edición. USA, 359 pp.
- Hecker B.G., 1993.** Carp, Koi, and Goldfish taxonomy and natural history. En: Fish medicine, Stoskopf M.K. (editor). W.B. Saunders company, USA, chapter 42, p. 442-447.

- Henny C.J., Blus L.J., Hoffman D.J. y Grove R.A., 1994.** Lead in hawks, falcons and owls downstream from a mining site on the Coeur D'Alene river, Idaho. *Environmental Monitoring and Assessment* 29, 267-288.
- Herbing S., Nikkanen J., Millen G. y Lilius H., 1970.**  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydrase as a measure of lead exposure. *Archives of Environmental Health* 21, 140-145.
- Hinton D.E., Baumann P.C., Gardner G.C., Hawkins W.E., Hendricks, J.D., Murchelano, R.A. y Okihiro, M.S., 1992.** Histopathologic biomarkers. En: Huggett R.J., Kimberly R.A., Mehrle P.M., Jr. y Bergman H.L. (Editores), Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Antropogenic Stress. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 162-175.
- Hinton D.E., 1994.** Cells, cellular responses, and their markers in chronic toxicity of fishes. En: Malins D.C. y Ostrander G.K. (Editores), Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives. Lewis Publishers CRC, pp. 207-240.
- Hirata M., Yoshida T., Miyajima K., Kosaka H. y Tabuchi T., 1995.** Correlation between lead in plasma and others indicators of lead exposure among lead-exposed workers. *International Archives of Occupational Environmental Health* 68, 58-63.
- Hodson P. V., 1976.**  $\delta$ -amino levulinic acid dehydratase activity of fish blood as an indicator of harmful exposure to lead. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 33, 268-271.
- Hodson P. V., Blunt, B. R., Spry, D. J. y Austen, K., 1977.** Evaluation of erythrocyte  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity as a short-term indicator in fish of a harmful exposure to lead. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34, 501-508.
- Hodson P. V., Blunt, B. R. y Spry, D. J., 1978.** Chronic toxicity of water-borne and dietary lead to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in lake Ontario water. *Water Research* 12, 869-878.
- Hoffman D.J., Franson J.C., Pattee O.H., Bunck C.M. y Murray H.C., 1985.** Biochemical and hematological effects of lead ingestion in nestling american kestrels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 80, 431-439.
- Hwang E. y Kim G., 2007.** Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology* 229, 1-10.
- IPCS, 1989.** Lead - environmental aspects. Environmental Health Criteria 85. World Health Organisation, International Programme on Chemical Safety (IPCS), Geneva, Switzerland.
- IPCS, 1995.** Inorganic lead - Environmental Health Criteria 165. International Programme on Chemical Safety. World Health Organisation, Geneva, Switzerland.

- Iwaszkiw J.M., 2001** Pesquerías Continentales del tramo Argentino de la Cuenca del Plata. Consejo Federal de inversiones, Documentos CFI Fired – negocios. Buenos Aires, Argentina.
- Jackim E., 1973.** influence of lead and others metals on fish  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 30, 560-562.
- Jaffe E.K., Martins J., Li J., Kervinen J. y Dunbrack R.L. Jr., 2001.** Molecular mechanism of lead inhibition of human porphobilinogen synthase. *Journal of Biological Chemistry* 276, 1531–1537.
- Jaffe E.K., 2003.** An unusual phylogenetic variation in the metal ion binding sites of porphobilinogen synthase. *Chemistry & Biology* 10: 25–34.
- Jaffe E.K., 2004.** The porphobilinogen synthase catalyzed reaction mechanism. *Bioorganic Chemistry* 32: 316–325.
- Janiot L. J., Marcucci O. y Gesino A., 1997.** Plaguicidas y bifenilos policlorados. En: Franja Costera Sur (FCS). Calidad de las Aguas de la Franja Costera Sur del Río de la Plata (San Fernando-Magdalena). Ed. Consejo Permanente para el Monitoreo de la Calidad de las Aguas de la Franja Costera Sur del Río de la Plata.
- Jin Z. y Wei-Wen H., 1988.** Concentrations of trace metals in the Qiantang-jiang river and its estuary southern China. *Ambio* 17:36-39.
- Johanson-Sjöbeck M. y Larsson A., 1979.** Effects of inorganic lead on delta-aminoilevulinic acid dehydratase activity and hematological variables in the rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 8, 419-431.
- Johnson F. M., 1998.** The genetic effects of environmental lead. *Mutation Research* 410, 123-140.
- Kakkar P. y Jaffery F.N., 2005.** Biological markers for metal toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19 (2): 335-349.
- Ketchum B.H., 1983.** Ecosystem of the world 26: Estuaries and enclosed seas. Elsevier Scientific Publishing Co., 481 p.
- Klerks P.L. y Levinton J.S., 1989.** En: Ecotoxicology: Problems and approaches. S.A. Levin, M.A. Harwell, J.R. Kelly y K.D. Kimball, editores. Speinger-Verlag, New York, Inc.; pp. 50-87.
- Krajnovic-Ozretic M. y Ozretic B., 1980.** The ALA-D activity test in lead-exposed grey mullet *Mugil auratus*. *Marine Ecological Prog. Ser.* 3, 187-191.
- Kutlu M. y Sümer S., 2007.** Some biochemical properties of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase in *Gammarus pulex*. *Food and Chemical Toxicology* 46, 115-118.

- Lai T. M., 1988.** En: The role of sediments in the chemistry of aquatic systems. US Geological Survey, Circular 969, pp. 56-64.
- Landrum P.F. Robbins J.A., 1990.** En: Sediments: chemistry and toxicity of in-Place Pollutants. R. Baudo, J.P. Giesy y H. Muntau, editores. Lewis Publishers, Inc.; pp. 237-263.
- Larsson A., Haux C., Sjobeck M. L., 1985.** Fish physiology and metal pollution results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 9, 250-281.
- Lehtonen K.K.; Schiedek D.; Köhler A.; Lang T.; Vuorinen P.J.; Förlin L.; Baršienė J.; Pempkowiak J. y Gercken J., 2006.** The BEEP projet in the Baltic Sea: Overview of results and outline for a regional biological effects monitoring strategy. *Marine Pollution Bulletin* 53, 523-537.
- Livingstone D.R., 1993.** Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of the Chemical Biotechnology* 57, 195-211.
- Long D. T. y Angino E. E., 1977.** Chemical speciation of Cd, Cu, Pb, and Zn in mixed freshwater, seawater, and brine solutions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 41, 1183-1191.
- López R.B., 1972.** Migración de peces en el río Bermejo. *GAEA* 15, 138-143.
- Lowe-Mc Connell R.H., 1987.** Ecological studies in tropical fish communities. Cambridge Univ. Press, 381 pp.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.L., Farr, A.L. y Randall, R.J., 1951.** Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Mahan C.A. y Holcombe J.A., 1992.** Immobilization of algae cells on silica gel and their characterization for trace metal preconcentration. *Analytical Chemistry* 64, 1933-1939.
- Malins D.C. y Ostrander G.K., 1991.** Perspectives in aquatic toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 31, 371-399.
- Manahan S.E., 2000.** Environmental chemistry. CRC, Press, Boca Ratón, FL, 898 pp.
- Martin L. K. Jr. y Black M. C., 1996.** Biomarker assessment of the effects of petroleum refinery contamination on channel catfish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 33, 81-87.
- Martin L. K. Jr. y Black M. C., 1998.** Biochemical assessment of the effects of coal strip-mine contamination on Channel Catfish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41, 307-320.
- Mason C.F., 1996.** Biology of freshwater pollution. Tercera edición. Longman, London, UK. 356 p.
- Matozzo V., Gagne F., Marin M.G., Ricciardi F. y Blaise C., 2007.** Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environment International* 34, 531-545.

- Mayer F.L., Versteeg D.J., McKee M.J., Folmar, L.C., Graney R.L., McCume D.C. y Rattner B.A., 1992.** Metabolic products as biomarkers. En: Huggett R.J., Kimberly R.A., Mehrle P.M., Jr. y Bergman H.L. (Editores), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Antropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 5-86.
- McCahon C.P. y Pascoe D., 1990.** Episodio pollution: causes, toxicological effects and ecological significance. *Functional Ecology* 4, 375-383.
- McCarthy J.F. y Shugart L.R., 1990.** En: *Biomarkers of environmental contamination*. J. F. McCarthy y L.R. Shugart, editores. Lewis Publishers. USA; pp. 3-14.
- Means J.C. y Wijayarathne R., 1982.** Role of natural colloids in the transport of hydrophilic pollutants. *Science* 215, 968-970.
- Menzer R.E., 1991.** En: *Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons*. M.O. Andur, J. Doull y C.D. Klaassen, editores. Pergamon Press, cuarta edición; pp. 872-902.
- Meredith P. A, Moore M. R. y Goldberg A., 1979.** Erythrocyte  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity and blood protoporphyrin concentrations as indices of lead exposure and altered haem biosynthesis. *Clinical Science* 56, 61-69.
- Monserat, J.M.; Martínez, P.E.; Geracitano, L.A.; Lund Amado, L.; Martínez Gaspar Martins, C.; Lopes Leães Pinho, G.; Soares Chaves, I.; Ferreira-Cravo, M.; Ventura-Lima, J. & Bianchini, A., 2006.** Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemical and Physiology Part C*, 146, 221-234.
- Moore M. N., Depledge M. H., Readman J. W., Paul L. D. R., 2004.** An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research* 552, 247-268.
- Morgan G.B. y Bretthauer E.W., 1977.** Metals in bioenvironmental systems. *Analytical Chemistry* 49, 1210-1214.
- Moriarty F., 1990.** *Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems*. Segunda edición. Academic Press, London. 289 p.
- Moss D.W., Henderson A.R. y Kochmar J.F., 1986.** En: *Textbook of clinical chemistry*. N.W. Tietz, editor. Saunders, Philadelphia, PA, pp. 663-678.
- Mullen M.D., Wolf D.C., Ferris F.G., Beveridge T.J., Fleming C.A y Bailey G.W., 1989.** Bacterial sorption of heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*. 55, 3143-3149.

- Murase T., Horiba N., Goto I., Yamato O., Ikeda T. y Sato K., 1993.** Erythrocyte ALA-D activity in experimentally lead-poisoned ducks and its change during treatment with disodium calcium EDTA. *Research in Veterinary Science* 55, 252-257.
- Musilová Z.; Oldřich Ř.; Janko K. y Jindřich Novák J., 2008.** Molecular phylogeny and biogeography of the Neotropical cichlid fish tribe Cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae: Cichlasomatinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46, 659–672.
- Nakagawa H., Nakagawa K. y Sato T., 1995 a.** Evaluation of erythrocyte 5-aminolevulinic acid dehydratase activity in the blood of carp *Cyprinus carpio*. *Fisheries Science* 61, 91-95.
- Nakagawa H., Sato T. y Kubo H., 1995 b.** Evaluation of chronic toxicity of water lead for carp *Cyprinus carpio* using its blood 5-aminolevulinic acid dehydratase. *Fisheries Science* 61, 956-959.
- Nakagawa H., Sato T. y Kubo H., 1995 c.** Method not requiring mercuric chloride for the determination of activity of 5-aminolevulinic acid dehydratase in blood of carp *Cyprinus carpio*. *Fisheries Science* 61, 97-99.
- Nakagawa H., Toshihiro T., Sato T. y Watanabe M., 1997 a.** Evaluation of erythrocyte 5-aminolevulinic acid dehydratase activity in the blood of crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*, as an indicator in fish of water lead pollution. *Journal of the Faculty of Agronomy, Kyushu University* 41, 205-213.
- Nakagawa H., Matsuo R., Sato T. y Watanabe M., 1997 b.** Storage method for blood that provides stability of erythrocyte 5-aminolevulinic acid dehydratase of carp *Cyprinus carpio* when used as an indicator of water lead pollution. *Journal of the Faculty of Agronomy, Kyushu University* 41, 215-221.
- Nakagawa K., Nakagawa H. y Aso Y., 1995.** The type of inhibition of erythrocyte 5-aminolevulinic acid dehydrase activity in the blood of carp *Cyprinus carpio* caused by lead and cadmium. *Science Bulletin of Faculty of Agronomy, Kyushu University* 50, 51-57.
- Nakemura M., Yasuhochi Y. y Minokami S., 1975.** *Journal of Biochemistry* 78, 373-380.
- Newman M. y Unger M., 2003.** Fundamentals of ecotoxicology. Segunda edición. Lewis Publishers. 458 p.
- Nogueira C. W., Soares F. A., Nascimento P. C., Muller D. y Rocha J. B., 2003.** 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmium- induced inhibition of  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase. *Toxicology* 184, 85-95.
- NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council, 1987.** Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspective* 74, 3-9.

- Nriagu J. O. y Pacyna J., 1988.** Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333, 134-139.
- Nriagu J. O., 1989.** A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*, 338, 47-48.
- Nriagu J. O., 1990.** Global metal pollution. Poisoning the biosphere? *Environment* 32, 7-32.
- Nussey G., van Vuren J.H.J. y du Preez H.H., 2000.** Bioaccumulation of chromium, manganese, nickel and lead in the tissues of the moggel, *Labeo umbratus* (Cyprinidae), from Witbank Dam, Mpumalanga. *Water S.A.* 26, 269-284.
- OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico), 1993.** Risk Reduction Monografía No.1: Lead. OECD Environment Monograph Series No. 65. OECD Environment Directorate, París, Francia, 112 pp.
- Ogunseitan O.A., Yang S. y Scheinbach E., 1999.** The delta- aminolevulinate dehydratase activity of *Vibrio alginolyticus* is resistant to lead (Pb). *Biological Bulletin* 197, 283-284.
- Ogunseitan O.A., Yang S. y Ericson J., 2000.** Microbial  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase as a biosensor of lead bioavailability in contaminated environments. *Soil Biology & Biochemistry* 32, 1899-1906.
- Okun D.A., 1991.** A water and sanitation strategy for the developing world. *Environment* 33, 16-43.
- Oldani N.O. y Oliveros O.B., 1984.** Estudios limnológicos en una sección transversal del tramo medio del Río Paraná. XII. Dinámica temporal de peces de importancia económica. *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral* 15, 175-183.
- Oldani N., 1990.** Variaciones de la abundancia de peces del valle del río Paraná. *Revista de Hydrobiología Tropical* 23, 67-76.
- Oldani N.; Iwaszkiw J.; Padín O. y Otaegui A., 1992.** Fluctuaciones de la abundancia de peces en el Alto Paraná (Corrientes, Argentina). Publicaciones de la Comisión Administradora del Río Uruguay. *Serie Técnico-Científica* 1, 43-55.
- Pacyna J. M. y Pacyna E. G. 2001.** An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. *Environmental Reviews* 9, 269-298.
- Pakalns P. y Farrar Y.J., 1977.** The effect of surfactants on the extraction-atomic absorption spectrophotometric determination of copper, iron, manganese, lead, nickel, zinc cadmium and cobalt. *Water Research* 11, 145-151.
- Pauza N.L., Pérez Cotti M.J., Godar L., Ferramola de Sancovich A.M. y Sancovich H.A., 2005.** Disturbances on Delta aminolevulinate dehydratase (ALA-D) enzyme activity by

- Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Li<sup>+</sup>: analysis based on coordination geometry and acid–base Lewis capacity. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99, 409–414.
- Peakall D., 1992.** Animal biomarkers as pollution indicators. Primera edición. Chapman & Hall, London. 291 p.
- Peakall D., 1994.** Biomarkers: the way forward in environmental assessment.. *Toxicology and Ecotoxicology News* 1: 55-60.
- Peri S.I., Arrieta M.A., Fink N.E. y Salibian A., 1998a.** Delta-aminolevulinic dehydratase (ALA-D) activity in blood of *Bufo arenarum* (Anura). *Biological Research* 31, 339-342.
- Peri S.I., Arrieta M.A. y Salibian A., 1998b.** Hematological parameters in *Bufo arenarum* injected with sublethal dose of lead acetate. *Biomedical and Environmental Sciences* 11, 70-74.
- Perottoni J, Rodrigues O. E. D., Paixão M. W., Zeni G., Lobato L. P., Braga A. L., Rocha J. B. T. y Emanuelli T., 2004.** Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. *Food and Chemical Toxicology* 42, 17-28.
- Petrucci R., Leonardi A. y Battistuzzi G., 1982.** The genetic polymorphism of delta-aminolevulinic dehydrase in Italy. *Human Genetic* 60, 289-290.
- Piotrowicz S.R., Ray B.J., Hoffman, G.L. y Duce R.A., 1972.** Trace metal enrichment in the sea-surface microlayer. *Journal of Geophysical Research* 77, 5243-5254.
- Polo C. F., Afonso S. G., Navone N. M., Rossetti M. V. y Batlle A. M. del C., 1995.** Zinc aminolevulinic acid dehydratase reactivation index as a tool or diagnosis of lead exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 32, 267-272.
- Pratt J. R., 1990.** En: Aquatic toxicology and risk assessment: Thirteenth Volume, ASTM STP 1096; W.G. Landis y W.H. van der Schalie, editores, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 16-26.
- Quiroga J. M., Sales D. y Gómez Parra A., 1989.** Experimental evaluation of pollution potential of anionic surfactants in the marine environment. *Water Research* 23, 801-807.
- Radünz Neto J., Lazzari R., de Araújo Pedron F., Veiverberg C.A., Taffarel Bergamin G., Corrêia V. y da Silva Filipetto J.E., 2006.** Alimentação da piava (*Leporinus obtusidens*) com diferentes fontes protéicas. *Ciência Rural, Santa Maria* 36, 1611-1616.
- Rand G. M. (ed). 1995.** Fundamentals of aquatic toxicology. Segunda edición. Francis & Taylor, London, UK, 1115 pp.
- Ringuelet R. A., Aramburu R. H. y Alonso A. de Aramburu., 1967.** Los peces argentinos de agua dulce. Provincia de Buenos Aires. Comisión de Investigaciones Científicas. La Plata.

- Roa H. y Permingeat E., 1999.** Composición y abundancia de la fauna íctica en dos estaciones de muestreo del embalse Yacyretá. Argentina. *Revista de Ictiología* 7, 49–57, special issue.
- Rocha J. T. B., Pereira M. E., Emanuelli T., Christofari R. S. y Souza D. O., 1995.** Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. *Toxicology* 100, 27-37.
- Rocha J.B.T., Tuerlinckx S. M., Schetinger M. R.C. y Folmer V., 2004.** Effect of group 13 metals on porphobilinogen synthase in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 200: 169– 176.
- Rodrigues A.L., Bellinaso M.L. y Dick T., 1989.** Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 94, 65-69.
- Roesijadi G. y Robinson W.E., 1994.** Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation, and release. En: Aquatic toxicology. molecular, biochemical, and cellular perspectives. Malins D. C. y G. K. Ostrander, editores, Lewis Publishers, USA, pp. 387-420.
- Rozman K.K. y Klaassen C.D., 2001. Absorption, distribution and excretion of toxicants.** En: Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. M.O. Andur, J. Doull y C.D. Klaassen, (Editores) New York, Mclaw-Hill, quinta edición; pp. 107-132.
- Sakai T., Yanagihara, S., Kunugi Y. y Ushio K., 1982.** Relationships between distribution of lead in erythrocytes *in vivo* and *in vitro* and inhibition of ALA-D. *Brit. J. Ind. Med.* 39, 382-387.
- Sanchez W., Piccini B., Ditché J.M. y Porcher J.M., 2008.** Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring. *Environment Internacional* 34, 791-798
- Santos J. L., Fontanellas A., Morán M. J. y Enríquez de Salamanca R, 1999.** Nonsynergic effects of ethanol and lead on heme metabolism in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 43, 98-102.
- Santos M. y Hall A., 1990.** Influence of inorganic lead on the biochemical blood composition of the eel, *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 20, 7-9.
- Santos R.S., Martins M.L., Marengoni N.G., Francisco C.J., Piazza R.S., Takahashi H.K. y Onaka E.M., 2005.** *Neoechinorhynchus curemai* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae)

- in *Prochilodus lineatus* (Osteichthyes: Prochilodontidae) from the Paraná River; Brazil. *Veterinaria Parasitológica* 134, 111-115.
- Sassa S., Granick S., Bickers D. R., Levere R. D. y Kappas A., 1973.** Studies on the inheritance of human erythrocyte  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase and uroporphyrinogen synthase. *Enzyme* 16, 326-333.
- Sassa S. y Bernstein S. E., 1977.** Levels of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase uroporphyrinogen I synthase and protoporphyrin IX in erythrocytes from anemic mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 1.181-1.184.
- Sassa S., 1978.** En: Heme and hemoproteins. F. DeMatteis y W.N. Aldridge, editores. Springer, Berlín Heidelberg New York, pp. 331-371.
- Sassa S., 1982.** Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28, 133-145.
- Schmitt C. J., Dwyer F. G. y Finger S. E., 1984.** Bioavailability of Pb and Zn from mine tailings as indicated by erythrocyte  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in suckers (Pisces: Catostomidae). *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science* 41, 1030-1040.
- Schmitt C. J., Wildhaber M. L., Hunn J. B., Nash T., Tieger M. N. y Steadman B. L., 1993.** Biomonitoring of lead-contaminated Missouri streams with an assay for erythrocyte  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity in Fish Blood. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 25, 464-475.
- Schmitt C. J., Whyte J. J., Roberts A. P., Annis M. L., May T. W. y Tillitt D. E., 2007.** Biomarkers of metals exposure in fish from lead-zinc mining areas of Southeastern Missouri, USA. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 31-47.
- Schütz A. y Skerfving S., 1976.** Effect of a short, heavy exposure to lead dust upon blood lead level, erythrocyte [delta]-aminolevulinic acid dehydratase activity and urinary excretion of lead, [delta]-aminolevulinic acid and coproporphirin. Results of a 6-month follow-up of two male subjects. *Scand. Journal Work Environmental Health* 3, 176-184.
- Schwartz B. S., Lee B., Stewart W., Ahn K., Springer K. y Kelsey K., 1995.** Associations of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase genotype with plant, exposure duration, and blood lead and zinc protoporphyrin levels in Korean lead workers. *American Journal of Epidemiology* 142 (7), 738-745.
- Schwartz B. S., Lee B., Lee G., Stewart W., Simon D., Kelsey K. y Tood A. C., 2000.** Associations of blood lead, dimercaptosuccinic acid-chelatable lead, and tibia lead with polymorphisms in the vitamin D receptor and delta-aminolevulinic acid dehydratase genes. *Environmental Health Perspectives* 108 (10), 949-954.

- Secchi G.C., Erba L. y Cambiaghi G., 1974.** Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity of erythrocytes and liver tissue in man. *Archives of Environmental Health* 28, 130-132.
- Shemin D. y Russel C. S., 1953.**  $\delta$ -aminolevulinic acid, its role en the biosynthesis of porphyrins and purines. *Journal American Chemical Society* 75, 4.873-4.874.
- Shimoni-Livny L., Glusker J.P. y Bock C.W., 1998.** Lone pair functionality in divalent lead compounds. *Inorganic Chemistry* 37, 1853–1867.
- Simkiss K., 1990.** Surface effects in ecotoxicology. *Functional Ecology* 4, 303-308.
- Simons T.J.B., 1995.** The affinity of human erythrocyte porphobilinogen synthase for  $Zn^{2+}$  and  $Pb^{2+}$ . *European Journal of Biochemistry* 234, 178-183.
- Sithisarankul P., Schwartz B. S., Lee B., Kelsey K.T. y Strickland P. T., 1997.** Aminolevulinic acid dehydratase genotype mediates plasma levels of neurotoxin, 5-aminolevulinic acid, in lead-exposed workers. *American Journal of Industrial Medicine* 32, 15-20.
- Smith R.A., Alexander R.B. y Wolman M.G., 1987.** Water-Quality Trends in the Nation's Rivers. *Science* 235, 1607-1615.
- Smith C. M., Wang X., Hu H. y Kelsey K., 1995.** A polymorphism in the human  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase gene may modify the pharmacokinetics and toxicity of lead. *Environmental Health Perspectives* 103 (3), 248-253.
- Sokal R. R., Rohlf F. J., 1997.** Biometry: The principles and practice of statistics in biological research. Wh Freeman and Co. San Francisco.
- SSRH (Subsecretaría de Recursos Hídricos), 2002.** Niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente. República Argentina.
- Sumpter J.P., 1995.** feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology Letters* 82-83, 737-742.
- Sumpter J.P., 1998.** Xenoendocrine disrupters-environmental impacts. *Toxicology Letter*, 102-103, 337-342.
- Suter G.W.H., 1993.** Ecological risk assesment. Lewis Publishers, Boca Ratón, USA, p. 538.
- Sverlig S.A., Espinach Ros A. y Orti G., 1993.** Sinopsis de los datos biológicos y pesqueros del sábalo *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847). *FAO, Sinopsis sobre la Pesca (FAO), no. 154.* Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Rome, Italy, 64 pp.
- Tablado A. y Oldani N.O., 1984.** Consideraciones generales sobre las migraciones de peces en el río Paraná. *Boletín de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral* 4, 31-34.

- Tanaka T., Kakizono T., Nishikawa S., Watanabe K., Sasaki K., Nishino N. y Nagai S., 1995.** Screening of 5-aminolevulinic acid dehydratase inhibitors. *Seibutsu-Kogaku Kaishi* 73, 13-19.
- Tanhuanpää S., Eeva T., Lehtikoinen E. y Nikinmaa M., 1999.** Developmental changes in 7-ethoxyresourfin-O-deethylase (EROD) and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activities in three passerines. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 124, 197-202.
- Timbrell J.A., 2000.** Principles of biochemical toxicology. Taylor and Francis, London.
- Tolar J.F., Mehollin A.R., Watson R.D. y Angus R.A., 2001.** Mosquito fish (*Gambusia affinis*) vitellogenin: identification, purification, and immunoassay. *Comparative Biochemical and Physiology Part C* 128, 237-245.
- Truhaut R., 1977.** Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology Environmental Safety* 1, 151-173.
- Tukker A., Buijst H., van Oers L. y van der Voet E. 2001.** Risks to health and the environment related to the use of lead in products. TNO Report STB-01-39 for the European Commission. Brussels, Directorate General Enterprise.
- UNESCO, 1988.** River inputs to ocean systems: status and recommendations for research. UNESCO Tech. Pap. Mar. Sci. 55, 25p.
- US EPA, 1971.** United States Environmental Protection Agency. Methods of chemical analysis of waters and wastes, Cincinnati, Ohio.
- U.S. EPA, 1994.** Lead fishing sinkers; response to citizens' petition and proposed ban. 40 CFR Part 745 [OPPTS-62134; FRL-4643-3]. Federal Register, 9 March 1994. United States Environmental Protection Agency.
- Valavidinis A., Vlahogianni T., Dassenakis M. y Scoullos M., 2006.** Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 178-189.
- Valsaraj M. y Thibodeaux C., 1989.** Relationships between micelle-water and octanol-water partition constants for hydrophobic organics of environmental interest. *Water Research* 23, 183-189.
- van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E., 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.
- Van Gastel C.A.M. y Van Brummelen T.C., 1996.** Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217-225.

- Vanparys C., Dauwe T., Campenhout K.V., Bervoets L., De Coen W. Blust, R. y Eens, M., 2008.** Metallothioneins (MTs) and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAd) as biomarkers of metal pollution in great tits (*Parus major*) along a pollution gradient. *Science of the Total Environment* 401, 184-193.
- Verrengia Guerrero N. R. y Kesten E. M., 1993.** Levels of heavy metals in biota from the la Plata river. *Environmental. Toxicology and Water Quality* 8, 335-344.
- Verrengia Guerrero N. R. y Kesten E. M., 1994.** Levels of heavy metals in waters from the la Plata river, Argentina: an approach to assess bioavailability. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 254-260.
- Verrengia Guerrero N.R., Mozzarelli M.N., Giancarlo H. y Nahabedian D., 1997.** *Biomphalaria glabrata*: relevance of albino organisms as a useful tool for environmental lead monitoring. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59, 822-827.
- Viessman W., 1990.** Water management. *Environment* 32, 11-35.
- Villar C., Stripeikis J., Colautti D., D'Huicque L., Tudino M. y Bonetto C., 2001.** Metals contents in two fishes of different feeding behaviour in the Lower Paraná River and Río de la Plata Estuary. *Hydrobiologia* 457, 225-233.
- Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M. y Peakall D.B., 2001.** Principles of Ecotoxicology (segunda edición). London, UK: Taylor & Francis.
- Weissberg J. B., Lipschutz F. y Oski F. A., 1971.**  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity in circulating blood cells. *The New England Journal of Medicine* 284, 565-569.
- Weissberg J. B. y Woytek P. E., 1974.** Liver and red cell porphobilinogen synthasa in the adult and fetal guinea pig. *Biochemical Biophysical Acta* 364, 304-319.
- Welcome R.L., 1985.** River fisheries. *Fao Fisheries Technical Paper* 262, 330 pp.
- Welcome R.L., 1988.** International introductions of inland aquatic species. *FAO Fisheries Technical Paper* 294.
- Wetmur J., 1994.** Influence of the common human  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on lead body burden. *Environmental Health Perspectives* 102, 215-218.
- WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1989.** Environmental health criteria for lead. World Health Organization, Geneva, 106 p.
- WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1993.** Biomarkers and risks assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria* 155, World Health Organization, Geneva.
- Wilson E.L., Burger P.E. y Dowdle E.B., 1972.** Beef-liver- $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase: purification and properties. *European Journal of Biochemistry* 29, 563-571.

- Witkowski P.J., Smith J.A., Fusillo T.V. y Chiou C.T., 1987.** A Review of surface-water sediment fractions and their interactions with persistent manmade organic compounds. United States Geological Survey, Circular 993, 39 p.
- Woods J. S., 1995.** Porphyrin metabolism as indicator of metal exposure and toxicity. En *Toxicology of metals. Biochemical aspects*. Ed Springer-Verlag, Berlín Heidelberg. Capítulo 2, 19-52.
- Work T.M. y Smith M.R., 1996.** Lead exposure in Laysan Albatross adults and chicks in Hawaii: prevalence, risk factors, and biochemical effects. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31, 115-119.
- Yagminas A. P. y Villeneuve D. C., 1987.** Kinetic parameters of the inhibition of red blood cell aminolevulinic acid dehydratase by triethyl lead and its reversal by dithiothreitol and zinc. *Journal of Biochemistry and Toxicology* 2, 115-124.
- Younes M., 1999.** Free radicals and reactive oxygen species. En: H. Marquardt, S.G. Schäfer, R. McClellan y F. Welsch (Editores), *Toxicology* (pp. 111-125). Elsevier Inc.