



Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco
Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud

Tesis doctoral

“Efectos de la exposición a arsénico y cadmio en la vieira
tehuelche (*Aequipecten tehuelchus*) del golfo San José
(Chubut)”

Lic. Julieta Sturla Lompré

Director: Dra. Mónica N. Gil
Co-director: Dra. Erica Giarratano
Puerto Madryn, Chubut, Argentina.

2020

Keep looking forward

La presente tesis fue realizada en el marco de una beca interna de CONICET dirigida por la Dra. Gabriela Malanga y co-dirigida por la Dra. Mónica Noemí Gil.

Resumen

La especie autóctona de vieira tehuelche, *Aequipecten tehuelchus*, fue seleccionada para estudiar la toxicidad aguda y crónica del arsénico (As) y cadmio (Cd), y sus efectos a través del uso de biomarcadores de estrés oxidativo. La toxicidad de estos elementos estaría relacionada con la producción de especies reactivas (ER) y el consecuente desbalance del estado redox celular, el cual activa la respuesta de un complejo sistema de defensa antioxidante. La vieira tehuelche es de gran importancia a nivel comercial en la zona del golfo San José, debido a su explotación por parte de una comunidad de pescadores artesanales. Si bien esta zona ha sido incorporada por SENASA para el cultivo de moluscos bivalvos para consumo humano directo, se ha detectado biodisponibilidad de estos elementos tóxicos dentro del golfo, cuyo origen sería natural. Se midieron los niveles naturales de As y Cd para determinar sus posibles relaciones con las fluctuaciones de varios biomarcadores de estrés oxidativo en la vieira. Biomarcadores oxidativos como ER, catalasa (CAT), glutatión S-transferasa (GST), superóxido dismutasa (SOD), metalotioneínas (MT), α -Tocoferol (α -T) y peroxidación lipídica (LPO), a través de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y radicales lipídicos (RL[•]), se determinaron en branquia, glándula digestiva y músculo en invierno (agosto de 2015) y verano (enero de 2016). Los niveles de As y Cd y de la mayoría de los biomarcadores (ER, SOD, TBARS y RL[•]) mostraron una fuerte variabilidad estacional en los tres tejidos, registrándose los más altos en la glándula digestiva. El índice de respuesta integrada de biomarcadores (IBR) indicó que la condición más estresada de *A. tehuelchus* fue en verano en San Román y mostró una fuerte relación con la acumulación de As y Cd en los tres tejidos. Se realizaron experiencias de exposición aguda por 96 horas y crónicas por 7 y 14 días con el fin de evaluar la acumulación de As y Cd en los tejidos de interés y su efecto a nivel bioquímico. La vieira tehuelche mostró una menor sensibilidad al As y mayor al Cd respecto a otras especies de bivalvos marinos. Ambos tóxicos exhibieron un efecto en los biomarcadores de estrés, siendo más acentuado en las experiencias crónicas. Si bien la glándula digestiva mostró mayores niveles de acumulación, la branquia fue el tejido con mayor respuesta bioquímica. De esta manera, los biomarcadores de estrés oxidativo demuestran ser buenos indicadores en evaluación de riesgo y detección temprana, permitiendo detectar exposiciones potencialmente tóxicas antes que los efectos adversos sean irreversibles y que se manifiesten en la población o comunidad.

Abstract

The native tehuelche scallop, *Aequipecten tehuelchus*, was selected to study the acute and chronic toxicity of arsenic (As) and cadmium (Cd), and their effects through the use of oxidative stress biomarkers. Their toxicity would be related to the production of reactive species and the consequent imbalance of the cellular redox state, which activates the response of a complex antioxidant defence system. The tehuelche scallop has a commercial importance in the San José gulf area (GSJ), due to its exploitation by a community of artisanal fishermen. Although this area has been incorporated by SENASA as a production area for live bivalve molluscs for direct human consumption, bioavailability of these toxic elements has been detected within the gulf, whose origin would be natural. Natural levels of As and Cd were measured to determine their possible relationships with the fluctuations of several biomarkers of oxidative stress in scallops. Oxidative biomarkers such as reactive species (ER), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), metallothioneins (MT), α -tocopherol (α -T) and lipid peroxidation (LPO) through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and lipid radicals (LR[•]) were measured in gills, digestive gland and muscle in winter (August 2015) and summer (January 2016). As and Cd levels and most of the biomarkers (ER, SOD, TBARS and LR[•]) showed a strong seasonal variability in the three tissues. In general, the highest values were recorded in the digestive gland. Experiences of acute exposure for 96 hours and chronic for 7 and 14 days were performed in order to assess the accumulation of As and Cd in the three tissues of interest and their effects at biochemical level. The tehuelche scallop showed a lower sensitivity to As and greater to Cd compared to other species of marine bivalves. Both toxics exhibited an effect on stress biomarkers, being more accentuated in chronic experiences. Although the digestive gland showed higher levels of accumulation, gills were the tissue with the highest biochemical response. In this way, oxidative stress biomarkers prove to be good indicators in risk assessment and early diagnosis, allowing to detect potentially toxic exposures before adverse effects are irreversible and before expressing at population or community level.

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco**, que me brindó la educación que hoy me permite alcanzar el título de Doctora en Ciencias Biológicas. Gracias a todos los que dentro de la Universidad hacen que las cosas sean más fáciles y amenas. A Santi, Marian y Elena.

Al **Laboratorio de Oceanografía Química y Contaminación de Aguas** del CENPAT, donde me formaron como alumna y como persona. A Miriam, Marta, Lei, Américo, Gabi, Mauri, Carmen, Jesi, José Luis y Mariana por compartir cada día con buena onda y siempre tratando de resolver cualquier conflicto que se presentara.

Un especial agradecimiento a mis directoras, Gabi, Eri y Moni, por haber confiado en mí y haberme dado todo el apoyo y las palabras de aliento en todo momento. Por transmitir su conocimiento permitiéndome aprender a ser profesional y no soltarme la mano en ningún momento. Por sus consejos, no solo académicos, por brindarme su valioso tiempo y por ser grandes partícipes en esta tesis. Sin ustedes esto no habría sido posible.

Al Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL-CONICET) y a la cátedra de Físicoquímica de FFyB-UBA por recibirme en sus instalaciones y permitirme usar los equipamientos necesarios para este trabajo de tesis. Al Lab 5, Nati, Eli, Pau, Juli, Juan, Joaquín, Flor y Gabi, porque, con pequeños gestos casi imperceptibles me brindaron apoyo, conocimiento, ayuda (muchísima ayuda), y sobre todo una cálida bienvenida al laboratorio. Un agradecimiento particular a la Dra. Susana Puntarulo, quien confió en mí para desarrollar mi tesis en el IBIMOL.

A Agus, quien me acompañó desde el inicio de mi carrera y con quien logramos ser no solo amigas sino colegas, aprendido cada día hombro a hombro sobre esta carrera que nos unió y que nos apasiona. Y por supuesto a su familia quienes me adoptaron y me hicieron parte con una calidez pura.

A la cátedra de Química Orgánica, Enriqueta, Marisa, Miriam, Franco y Cynthia con quienes compartimos muchas horas y me dieron un lugar a la par suyo para formarme y aprender a enseñar.

A mis amigas, Carola, Vale y Romy. Sin sus palabras, chistes, cenas y consejos, esto no habría sido posible.

A las ex-gamélicas, Laly, Polli, Carola, Flor y Mai con quienes compartimos muchas horas y charlas y siempre estuvieron para darme su consejo y aliento.

A Fer y a Naty por acompañarme en todos estos años.

Finalmente, a las personas más importante en mi vida. Mi familia. Mis tíos, Patricia, Luis, Mabel. Mis padrinos, la tía Patricia, el tío Ricardo, Clody y la madrina (Ale). Gracias a ellos hoy estoy donde estoy y puedo avanzar hacia adelante y tomar cualquier camino que desee, porque con su confianza en mí nada parece imposible de lograr.

A mi papá y mi mamá, quienes siempre están y nunca perdieron la fe en mí incluso cuando yo la había perdido. Cada vez que pensé que no iba a poder seguir estuvieron ahí para darme la confianza en mí que yo perdí algunas cuantas veces. Gracias por darme el apoyo y recordarme siempre que nada es imposible pese a las piedras que se nos interpongan en el camino. Les agradezco su continua enseñanza sobre la vida, su optimismo y su noción sobre las cosas realmente importantes en la vida. Un eterno gracias por permitirme ser y acompañarme siempre. Su locura es mi ejemplo.

A mi hermana le agradezco por ser mi conciencia, mi consejera, mi cómplice y mi gran compañera en esta vida. Sin su apoyo, confianza y pleno entendimiento de cada circunstancia que se cruzó en mi camino nunca hubiera podido terminar esta carrera.

A mi hermanito, quien siempre está presente y que con su inocencia me enseña sobre las cosas importantes en esta vida.

A todos los que contribuyeron con pequeños gestos y me dieron la palabra justa en el momento justo y hoy estoy acá gracias al conjunto de esas palabras que me alentaron.

GRACIAS A TODOS POR SU APOYO!!!

Índice

Índice de figuras y tablas.....	9
Abreviaturas	15
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	18
1.1. Los bivalvos como bioindicadores	20
1.1.1. La vieira tehuelche del golfo San José como modelo ecotoxicológico	21
1.2. Arsénico	23
1.1.1. Generalidades	23
1.3. Cadmio.....	26
1.3.1. Generalidades	26
1.4. Toxicidad del arsénico y cadmio y sistemas de defensa.....	29
1.4.1. Mecanismos de toxicidad del arsénico y cadmio	29
1.4.2. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante	29
1.4.3. Enzimas antioxidantes.....	31
1.4.4. Metalotioneínas	32
1.4.5. α -Tocoferol.....	32
1.4.6. Lipoperoxidación	32
1.4.7. Índice de respuesta integrada de biomarcadores (IBR).....	33
1.5. Objetivos e hipótesis	35
1.6. Organización de la tesis	37
2. METODOLOGÍA	38
2.1. Área de estudio	39
2.2. Organismo de estudio	40
2.3. Caracterización ambiental.....	40
2.4. Ensayos toxicológicos.....	41
2.4.1. Recolección y aclimatación de los organismos.....	41

2.4.2.	Ensayos de letalidad	42
2.4.3.	Ensayos de subletalidad	45
2.5.	Análisis de arsénico y cadmio en agua, sedimento y organismos	46
2.6.	Análisis bioquímicos.....	47
2.6.1.	Especies reactivas (ER).....	48
2.6.2.	Enzimas antioxidantes.....	48
2.6.3.	Metalotioneínas (MT)	49
2.6.4.	Contenido de α -Tocoferol	49
2.6.5.	Lipoperoxidación (LPO)	50
2.7.	Análisis de datos	50
2.7.1.	Análisis estadísticos	50
2.7.2.	Evaluación de riesgos para la salud humana.....	51
2.7.3.	Índice de respuesta integrada de biomarcadores (IBR).....	52
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		54
3.	CARACTERIZACIÓN AMBIENTAL	54
3.1.	Análisis de arsénico y cadmio	55
3.1.1.	Agua y sedimentos	55
3.1.2.	Organismos	58
3.1.3.	Límites del CAA y cociente de riesgo (THQ)	61
3.1.4.	Biodisponibilidad del As y Cd	62
3.2.	Biomarcadores de estrés oxidativo	64
3.2.1.	Especies reactivas y enzimas antioxidantes	64
3.2.2.	Metalotioneínas	68
3.2.3.	α -Tocoferol.....	69
3.2.4.	Lipoperoxidación (LPO)	69
3.2.5.	Efectos de la estacionalidad en biomarcadores de estrés	71

3.2.6.	Índices	72
3.2.7.	Correlación entre arsénico y cadmio y biomarcadores de estrés oxidativo 75	
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
4.	Efectos letales y subletales de arsénico en <i>Aequipecten tehuelchus</i>	77
4.1.	Ensayos de letalidad.....	78
4.1.1.	Determinación de la concentración letal media (CL ₅₀) de As.....	78
4.1.2.	Acumulación de As en <i>A. tehuelchus</i> expuestas 96 h	79
4.1.3.	Indicadores de estrés oxidativo	81
4.1.4.	IBR en experimentos de CL ₅₀ As.....	84
4.2.	Ensayos subletales	86
4.2.1.	Acumulación de As en <i>A. tehuelchus</i> expuestas 7 y 14 días.....	86
4.2.2.	Indicadores de estrés oxidativo	88
4.2.3.	IBR en experimentos subletales con As.....	97
4.3.	Correlaciones entre as, biomarcadores e IBR.....	99
4.3.1.	Niveles de As acumulado y biomarcadores de estrés oxidativo	99
4.3.2.	Acumulación de As, niveles de exposición e IBR	100
4.4.	Ensayos agudos vs. crónicos.....	101
4.5.	Consideraciones finales: efecto del As en <i>A. tehuelchus</i>	102
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	106
5.	Efectos letales y subletales de cadmio en <i>Aequipecten tehuelchus</i>	106
5.1.	Ensayos de letalidad.....	107
5.1.1.	Determinación de la concentración letal media (CL ₅₀) de Cd	107
5.1.2.	Indicadores de estrés oxidativo	108
5.1.3.	IBR en experimentos de CL ₅₀ Cd.....	111
5.2.	Ensayos subletales	112

5.2.1.	Indicadores de estrés oxidativo	112
5.2.2.	IBR en experimentos subletales con Cd.....	120
5.3.	Correlaciones entre cd, biomarcadores e IBR	121
5.3.1.	Niveles de exposición de Cd, biomarcadores de estrés oxidativo e IBR 121	
5.4.	Ensayos agudos vs. crónicos	123
5.5.	Consideraciones finales: efecto del Cd en <i>A. tehuelchus</i>	124
6.	CONCLUSIONES	129
	Conclusiones	130
	BIBLIOGRAFÍA	132

Índice de figuras y tablas

FIGURAS

- Fig. 1.** Intermediarios en la reducción parcial del O₂. Tomado de Bonetto, 2019..... 30
- Fig. 2.** Consecuencias toxicológicas del ataque de los radicales libres y principales defensas antioxidantes enzimáticas. Tomada de Fernández Galindo (2012). 30
- Fig. 3.** a) Ubicación de los sitios de estudio San Román (b) y El Riacho (c) en el golfo San José en Patagonia, Argentina. 39
- Fig. 4.** Vieira tehuelche, *Aequipecten tehuelchus*, en acuarios experimentales (a). Vista interna de *A. tehuelchus* (b). Br = branquias. GD = glándula digestiva. Mu = músculo. Go = gónada..... 40
- Fig. 5.** Adición de solución madre a acuarios con agua de mar (a). *A. tehuelchus* en acuarios con agua de mar contaminada con As (b). 42
- Fig. 6.** Esquema del ensayo de búsqueda de rangos para determinar las concentraciones a ensayar en CL₅₀. 43
- Fig. 7.** Esquema ensayo de toxicidad con As para la determinación de la CL₅₀ a 96 h de exposición. 44
- Fig. 8.** Esquema ensayo de toxicidad con As y Cd a concentraciones subletales a 7 y 14 días de exposición. 46
- Fig. 9.** Concentración total de As (a) y Cd (b) (µg/g ps) en branquia, glándula digestiva y músculo de *A. tehuelchus* del golfo San José. 59
- Fig. 10.** Cocientes de riesgo (THQ) del consumo de *A. tehuelchus* en los branquia, glándula digestiva y músculo y en el tejido blando completo para As inorgánico y Cd.62
- Fig. 11.** ER (a), actividades de SOD (b), CAT (c) y GST (d) en branquia, glándula digestiva y músculo de *A. tehuelchus* de San Román y El Riacho en invierno y verano. 65
- Fig. 12.** Detección de radicales lipídicos (RL•) por EPR. Simulación computada mostrando desdoblamiento hiperfino característicos del aducto PBN/RL• aN=15.8 G y

aH=2.6 G (a), espectro de EPR de N-t-butil- α -fenil nitrona (PBN) (b) y espectro de EPR de glándula digestiva de San Román en invierno (c)..... 70

Fig. 13. Valores estandarizados de los biomarcadores seleccionados (GST, SOD y TBARS en glándula digestiva, MT en músculo y, TBARS y GST en branquias) en San Román en invierno (a) y verano (b) y en El Riacho en verano (c). Valores de IBR para cada sitio y temporada (d). GST = glutatión S-transferasa, SOD = superóxido dismutasa, TBARS = especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, MT = metalotioneínas)..... 75

Fig. 14. Porcentaje de mortalidad en *A. tehuelchus* expuestas durante 24, 48, 72 y 96 h a 0; 4; 5; 6,3; 7,9 y 10 mg As/L (media \pm desvío estándar). Cada tratamiento se realizó por triplicado (n = 6)..... 78

Fig. 15. Concentración de As en branquia, glándula digestiva y músculo de la vieira *A. tehuelchus* luego de 96 h de exposición. 79

Fig. 16. ER (a), actividad de CAT (b) y GST (c) y contenido de MT (d) en branquia, glándula digestiva y músculo en *A. tehuelchus*, expuestos durante 96 h a diferentes concentraciones de As. 82

Fig. 17. Niveles de TBARS y α -T en branquia, glándula digestiva y músculo en *A. tehuelchus*, expuestos durante 96 h a diferentes concentraciones de As. 83

Fig. 18. Índice de TBARS/ α -T en branquia, glándula digestiva y músculo en *A. tehuelchus*, expuestos durante 96 h a diferentes concentraciones de As. 83

Fig. 19. IBR a diferentes concentraciones de exposición de As (a); acumulación de As en branquia (b), glándula digestiva (c) y músculo (d) de *A. tehuelchus*. 85

Fig. 20. Acumulación de As en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* analizados al inicio de experimento (T = 0), a los 7 (T = 7) y 14 (T = 14) días de exposición en todos los tratamientos. 86

Fig. 21. ER en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de As. 91

Fig. 22. Actividad de CAT en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de As. 92

Fig. 23. Actividad de GST en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de <i>A. tehuelchus</i> al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de As.	93
Fig. 24. Contenido de MT en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de <i>A. tehuelchus</i> al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de As.	94
Fig. 25. TBARS en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de <i>A. tehuelchus</i> al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de As.	95
Fig. 26. Contenido α -T en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de <i>A. tehuelchus</i> al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de As.	96
Fig. 27. IBR a diferentes concentraciones de exposición de As durante 7 (a) y 14 (b) días en <i>A. tehuelchus</i>	98
Fig. 28. Tendencia general de los efectos de concentraciones de As letales (a) y subletales (b) en branquia, glándula digestiva y músculo en <i>A. tehuelchus</i> , expuestos durante 96 h, 7 y 14 d.	104
Fig. 29. Porcentaje de mortalidad en <i>A. tehuelchus</i> expuestas durante 24, 48, 72 y 96 h a 0; 25; 50; 100; 150; 204; 275; 371 y 500 $\mu\text{g Cd/L}$. Los datos corresponden a la media \pm desvío estándar de la media de cada tratamiento realizado por triplicado (n=6).	107
Fig. 30. ER (a), actividad de CAT (b) y GST (c) y contenido de MT (d) en branquia, glándula digestiva y músculo en organismos de <i>A. tehuelchus</i> , expuestos durante 96 h a diferentes concentraciones de Cd.	109
Fig. 31. Niveles de TBARS y α -T en branquia, glándula digestiva y músculo en organismos de <i>A. tehuelchus</i> , expuestos durante 96 h a diferentes concentraciones de Cd.	110
Fig. 32. Índice de TBARS/ α -T en branquia, glándula digestiva y músculo en organismos de <i>A. tehuelchus</i> , expuestos durante 96 h a diferentes concentraciones de Cd.	111
Fig. 33. IBR a diferentes concentraciones de exposición de Cd.....	112

Fig. 34. ER en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de Cd..... 114

Fig. 35. Actividad de CAT en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de Cd. 115

Fig. 36. Actividad de GST en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de Cd. 116

Fig. 37. Contenido de MT en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de Cd. 117

Fig. 38. TBARS en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de Cd..... 118

Fig. 39. Contenido α -T en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de Cd. 119

Fig. 40. IBR a diferentes concentraciones de exposición de Cd a los 7 (a) y 14 (b) días en *A. tehuelchus*. 120

Fig. 41. Tendencia general de los efectos de concentraciones de Cd letales (a) y subletales (b) en branquia, glándula digestiva y músculo de *A. tehuelchus*, expuestos durante 96 h, 7 y 14 d. 127

TABLAS

Tabla 1. Niveles de As y Cd en agua y sedimentos en San Román y El Riacho. Los resultados se expresan como media \pm ES (n=3).	55
Tabla 2. Parámetros físico-químicos del agua de mar en los sitios de estudio.	58
Tabla 3. ANOVA dos vías: efectos de temporada estacional y sitio en los niveles de As y Cd y biomarcadores en <i>A. tehuelchus</i> . Los efectos significativos ($p < 0,05$) están resaltados en negrita.....	67
Tabla 4. Contenido de MT, α -T, TBARS y RL• en invierno y verano para ambos sitios de estudio en cada tejido. Los resultados se expresan como media \pm ES (n=5).....	69
Tabla 5. TBARS/ α -T y RL•/ α -T en tejidos de <i>A. tehuelchus</i> . Los resultados se expresan como media \pm ES (n=5).....	73
Tabla 6. Coeficiente de correlación entre los niveles de As y Cd y los biomarcadores ambiental. Los números en negrita indican correlaciones significativas a $p < 0,05$	76
Tabla 7. Relación entre niveles de exposición de As y acumulación de As en branquia, glándula digestiva y músculo de <i>A. tehuelchus</i> luego de exposiciones agudas de 96 h (4; 5; 6,3 y 7,9 mg As/L).....	80
Tabla 8. IBR a diferentes concentraciones de exposición de As en <i>A. tehuelchus</i> . Las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA – Test de Tukey, $p < 0,05$). DE: desvío estándar.	84
Tabla 9. ANOVA dos factores: efecto de la concentración y tiempo de exposición de As en biomarcadores y acumulación de As en <i>A. tehuelchus</i>	87
Tabla 10. Coeficiente de determinación entre niveles de exposición y acumulación de As en branquia, glándula digestiva y músculo de <i>A. tehuelchus</i> luego de exposiciones crónicas de 7 y 14 días (0; 125; 500; 1000 μ g As/L).....	87
Tabla 11. ANOVA dos factores: efecto de la concentración y tiempo de exposición de As en biomarcadores en <i>A. tehuelchus</i>	90
Tabla 12. Relación TBARS/ α -T en branquia, glándula digestiva y músculo de <i>A. tehuelchus</i> para los cuatro tratamientos a 0, 7 y 14 días de experimentación. Los resultados se expresan como media \pm ES (n=3).	97

Tabla 13. IBR a diferentes concentraciones de As durante 7 y 14 días de exposición en <i>A. tehuelchus</i> . Las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA - Test de Tukey; $p < 0,05$). DE: desvío estándar.....	98
Tabla 14. Coeficiente de correlación entre los niveles de As acumulados en cada tejido y los biomarcadores analizados a las 96 h de exposición.	99
Tabla 15. Coeficiente de correlación entre los niveles de As y los biomarcadores analizados a los 7 y 14 días de exposición.....	100
Tabla 16. Coeficiente de correlación entre los niveles de As acumulados en cada tejido y la exposición a As y el IBR.	101
Tabla 17. IBR a diferentes concentraciones de exposición de Cd en <i>A. tehuelchus</i> . Las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA – Test de Tukey, $p < 0,05$). DE: desvío estándar.	112
Tabla 18. ANOVA dos factores: efecto de la concentración y tiempo de exposición de As en biomarcadores en <i>A. tehuelchus</i>	113
Tabla 19. Relación TBARS/ α -T en branquia, glándula digestiva y músculo de <i>A. tehuelchus</i> para los cuatro tratamientos a 0, 7 y 14 días de experimentación. Los resultados se expresan como media \pm ES (n=3).	120
Tabla 20. IBR a diferentes concentraciones de Cd a los 7 y 14 días de exposición en <i>A. tehuelchus</i>	121
Tabla 21. Coeficiente de correlación entre los niveles de exposición de Cd y los biomarcadores analizados a las 96 h de exposición.....	122
Tabla 22. Coeficiente de correlación entre los niveles de exposición de Cd y los biomarcadores analizados a los 7 y 14 días de exposición.	123

Abreviaturas

As: arsénico

Br: branquia

BMDL: límite inferior de confianza de la dosis de referencia

BRT: modelo de árbol de regresión reforzado

BSA: albúmina sérica bovina

CAA: Código Alimentario Argentino

CAT: catalasa

CCME: Consejo Canadiense de Ministros del Ambiente.

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno

CL₅₀: concentración letal media

DCFH-DA: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

DE: desvío estándar

DMA: ácido dimetilarsénico

DMSO: dimetilsulfóxido

DTNB: 5,5-ditio-2-bis-nitrobenzoato

DTT: ditioneitol

EAA: espectroscopía de absorción atómica

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EFSA: Autoridad Europea sobre Seguridad Alimentaria

EPR: resonancia paramagnética electrónica

ER: especies reactivas

ERO: especies reactivas del oxígeno

ES: error estándar de la media

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

GD: glándula digestiva

Go: gónada

GSH: glutatión reducido

GSJ: golfo San José

GSSG: glutatión oxidado

GST: glutatión S-transferasa

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HEPES: N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[ácido 2-etanosulfónico]

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

IBR: índice de respuesta integrada de biomarcadores

IARC: Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer

ICP-AES: Espectrómetro de Absorción Atómica por Plasma de Acoplamiento Inductivo

ICP-OES: Espectrómetro de Emisión Óptica por Plasma de Acoplamiento Inductivo

ISTP: ingesta semanal tolerable provisional

LPO: lipoperoxidación

MDA: malondialdehido

MMA: ácido monometilarsénico

MT: metalotioneínas

Mu: músculo

NADH: nicotinamida-adenina dinucleótido

NADPH: nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido

NaOH: hidróxido de sodio

PBN: N-tert-butil-a-fenil nitrona

ph: peso húmedo

ps: peso seco

PTWI: ingesta semanal tolerable provisional

PV: Península Valdés

R: El Riacho

SDS: dodecilsulfato de sodio

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

SOD: superóxido dismutasa

SR: San Román

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

TBT: tributilestaño

TCA: ácido tricloroacético

THQ: cociente de riesgo

US EPA: Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos

u.a.: unidades arbitrarias

WHO: Organización Mundial de la Salud

α -T: alfa tocoferol

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

CAPÍTULO 1. Introducción general

La zona marina costera recibe desde el continente una amplia gama de desechos industriales, agrícolas y domésticos que contienen contaminantes y que pueden ejercer un impacto negativo en las comunidades bióticas. El medio marino también es receptor de aportes directos de contaminantes de la atmósfera y de las industrias en alta mar, incluidas la perforación para extracción de petróleo y la minería. La exposición a contaminantes puede inducir una extensa variedad de efectos biológicos en organismos que incluyen respuestas bioquímicas, inmunológicas, fisiológicas y bioenergéticas al estrés, crecimiento alterado y producción reproductiva, entre otros. Dependiendo de la naturaleza exacta y la escala temporal y espacial de la respuesta biológica, los impactos en los individuos pueden tener implicaciones a nivel de población, comunidad y ecosistema (Marsden y Cranford, 2016).

La contaminación por metal(oid)es en la zona costera Patagónica, ha sido principalmente evaluada a través de estudios en sedimentos y/u organismos e incluyen la medición de elementos tóxicos y potencialmente tóxicos, tales como Zn, Cu, Cr, Hg, Pb, Sn, Cd y/o As. Hasta el momento, el diagnóstico de mayor preocupación fue realizado a partir del estudio en sedimentos de la Bahía de San Antonio (Golfo de San Matías) en la década del '90 (Gil y col., 1999), comprobándose posteriormente la bioacumulación de Pb y otros metales en invertebrados marinos de dicha región (Giarratano y col., 2016; Vázquez y col., 2007). La fuente se asoció a los desechos de una mina abandonada en la zona terrestre próxima a la costa, comprobándose además la presencia de Pb en sangre de niños de la ciudad de San Antonio Oeste, por encima de los niveles seguros (Alderete y col., 2009). Actualmente, aunque las concentraciones han disminuido, los desechos aún representan un riesgo para la salud humana y solo recientemente se ha iniciado una estrategia de remediación (Marinho y col., 2017).

Más allá de la Bahía de San Antonio, la contaminación por metal(oid)es en sedimentos de la Patagonia se ha considerado baja a moderada y principalmente asociada a ciudades y puertos (Esteves y col., 2006; Gil y col., 1999). Los estudios en la biota han incluido organismos de diferentes niveles tróficos. En aves y mamíferos marinos las concentraciones halladas fueron calificadas como bajas (Frias y col., 2012; Gil y col., 2006b; Martino y col., 2012; Rosas y col., 2012), aunque no necesariamente seguras, ya que los efectos de los metales en mamíferos y aves marinas son en gran medida

desconocidos (Martino y col., 2013). Entre los organismos de niveles tróficos más bajos, existe vasta investigación referida a metal(oid)es en bivalvos (Comoglio y col., 2011; Conti y col., 2011; Duarte y col., 2011; Giarratano y col., 2014, 2013, 2011; Giarratano y Amin, 2010; M. Gil y col., 2006; Marinho, 2011; Pérez y col., 2005; Vázquez y col., 2007), gasterópodos (Bigatti y col., 2009; Primost y col., 2017, Commendatore y col., 2015, Del Brio y col., 2016) y macroalgas (Gil y col., 2015; Pérez y col., 2007). Los resultados de estos estudios destacan la presencia de Cd y As en algunos tejidos comestibles, con niveles próximos o mayores a los permitidos para consumo humano, aun cuando no existen fuentes antropogénicas o influencia humana directa que lo justifique.

1.1. LOS BIVALVOS COMO BIOINDICADORES

Los bivalvos son organismos con una amplia distribución geográfica, abundantes, sésiles y capaces de acumular contaminantes desde el medio por su alimentación por filtración, y siendo relativamente sensibles a una amplia gama de contaminantes (Alves de Almeida y col., 2007; Marsden y Cranford, 2016; Velez y col., 2016b). Han sido ampliamente utilizados como especies centinelas para monitorear la contaminación ambiental, cuantificando la concentración de contaminantes en los tejidos blandos (Moschino y col., 2016). Debido a su hábito de alimentación por filtración, los bivalvos se encuentran entre los organismos más vulnerables a la absorción de sustancias disueltas y particuladas, tanto de origen natural como antrópico (Conti y col., 2011; Giarratano y col., 2010; Maulvault y col., 2015). En este sentido, pueden incorporar trazas de elementos tóxicos ubicuos a través del agua de mar, los sedimentos y/o el fitoplancton, y luego acumularlos en sus tejidos. Esto podría eventualmente resultar en una condición de estrés para el organismo, una transferencia de tóxicos a través de la red trófica (Ng y col., 2005) y un potencial riesgo para la salud humana por su ingesta (Edmonds y Francesconi, 1993; Storelli, 2008). Las características mencionadas, han determinado que sean objeto de estudio en numerosos ensayos toxicológicos tendientes a evaluar los efectos de diferentes compuestos (Chelomin y Belcheva, 1991; Gould y col., 1988; Metian y col., 2008; Nardi y col., 2018; Nelson y col., 1988; Quinn y col., 2005; Sobrino-Figueroa y col., 2007; Viarengo y Nott, 1993).

El nivel, duración y ruta de exposición, el historial previo de exposición y la etapa de desarrollo son factores importantes que determinan la respuesta de los biomarcadores

fisiológicos a un tóxico potencial (Bouskill y col., 2006). Los ensayos de letalidad pueden ser reflejo de altas exposiciones periódicas desde una fuente de contaminación puntual. Sin embargo, es probable que las exposiciones crónicas o subcrónicas sean más representativas del escenario de exposición ambiental. Examinar las respuestas de biomarcadores durante un período más largo y a una concentración de exposición más baja, aporta información para una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la adaptación de los organismos frente a la presencia de un contaminante metálico (Chandurvelan y col., 2012).

Debido a su alto valor comercial, los pectínidos (familia Pectinidae) han recibido considerable atención en estudios de acumulación, distribución y efectos biológicos de contaminantes tanto en zonas prístinas (Krishnakumar y col., 2016; Lai y col., 1999; Liu y col., 2012; Uthe y Chou, 1987) como contaminadas (Duarte y col., 2012; Milinkovitch y col., 2015; Zuykov y col., 2013).

1.1.1. La vieira tehuelche del golfo San José como modelo ecotoxicológico

La vieira tehuelche, *Aequipecten tehuelchus* (D'Orbigny, 1846), es un bivalvo de hábito bentónico, que pertenece a la familia Pectinidae, del orden Pectinida. Si bien posee filamentos bisales para fijación, se encuentra principalmente reposando en el fondo sobre su valva inferior pudiendo hacer uso de la natación para desplazarse. Es un organismo que consume plancton del agua, filtrándola a través de las branquias. Posee una única gónada que se halla adherida al único músculo aductor y, está dividida en una zona femenina y otra masculina con diferente coloración durante la época de madurez reproductiva. La porción naranja intensa corresponde al área productora de óvulos y la amarilla crema a la productora de espermatozoides. Su período de desove se extiende a lo largo de 4 meses, iniciando entre mediados y fines de primavera (desoves parciales) y terminando hacia fines del verano (desoves totales) (Narvarte, 2003; Soria y col., 2016).

El peso también varía estacionalmente, asociado con la disponibilidad de alimentos, la temperatura y con el ciclo reproductivo. El músculo aductor crece durante el otoño, y la gónada durante el final del invierno/principios de la primavera, lo que sugiere que la energía de los alimentos se desvía secuencialmente para el almacenamiento de reserva (otoño) y la maduración gonadal (primavera). El peso del músculo, la gónada y otros

tejidos disminuyen después del desove (verano) (Soria y col., 2016). Se considera talla comercial a partir de los 60 mm de largo (Narvarte, 1995).

El Golfo San José (GSJ), situado en la Patagonia Norte (42°20'S, 64°20'O), posee condiciones geográficas y ecológicas favorables para el asentamiento de recursos naturales de gran interés pesquero. Simultáneamente, el área tiene relevancia como punto turístico y por la preservación de la fauna (Ciocco, 1995). Esto llevó a la provincia del Chubut a crear el Parque Marino Provincial Golfo San José mediante la Ley 1238/74, modificada luego por la Ley 1713/79 para permitir el desarrollo de actividades económicas dentro del Parque. En el año 2001, se sancionó la Ley 4722 que crea el Área Natural Protegida Península Valdés, quedando así el parque incorporado en esta área.

De esta manera, su preservación exige evaluar el riesgo que implica la presencia de contaminantes en GSJ, tanto para el propio recurso como para el hombre debido a su consumo. En ese sentido, en la década del '80, Gil y col. (1988) reportaron por primera vez niveles de Cd en bivalvos por encima del límite permisible para consumo humano (2000 µg/kg peso húmedo (ph) de carne) (Código Alimentario Argentino (CAA), 2019, 2012), aun cuando las mediciones en sedimentos eran no detectables (Harvey y Gil, 1988b; Mohamed, 2008). Mohamed (2008) encontró la misma tendencia en vieiras y Duarte y col. (2012) y Primost y col. (2017) en otros invertebrados. Más recientemente Gil y col (2015) registraron niveles de Cd y de As total en tejidos de *Undaria Pinnatifida* que superaron los límites permitidos para consumo humano (European Food Safety Authority (EFSA), 2009).

Es claro que tanto el As como el Cd biodisponible en el GSJ, tendrían un origen natural, relacionado con su biogeoquímica y corrientes costeras ascendentes (Conti y col., 2016; Segovia-Zavala y col., 1998), dado que la actividad antrópica en dicho golfo se limita a la marisquería artesanal y comercial a pequeña escala, no existiendo ciudades, industrias o puertos adyacentes que permitan suponer la existencia de una fuente antropogénica.

En ese sentido, es importante conocer de qué manera el organismo afronta las condiciones actuales y cómo podría modificarse su estado de salud, frente a un aumento de las concentraciones biodisponibles, ya sea directamente por aportes antrópicos, o indirectamente por modificación de los ciclos biogeoquímicos, por ejemplo, en un escenario de cambio climático. Desde el punto de vista socio-económico, los estudios en

esta área representan un aporte clave ya que los bancos de vieiras estudiados son los más explotados por pescadores artesanales, cuya principal fuente de ingreso económico es la venta de este recurso en el mercado local.

1.2. ARSÉNICO

1.1.1. Generalidades

El As se encuentra en cantidades abundantes en la corteza terrestre, como consecuencia de procesos naturales como vulcanismo, incendios forestales o erosión de rocas y minerales. Entre sus principales fuentes antropogénicas se encuentran la minería, la fundición de metales como cobre y plomo, obtención de aleaciones, plantas eléctricas de carbón. Es utilizado en la elaboración de medicamentos y plaguicidas, y en conservantes de la madera. En las últimas décadas la utilización de plaguicidas arsenicales ha sido considerada como la fuente principal de contaminación ambiental (Nordstrom, 2002).

Debido a sus características químicas tiene una gran movilidad en el ambiente, principalmente como sales y ácidos de As (Mandal y Suzuki, 2002). El As en los suelos puede ser disuelto y adsorbido/absorbido por las arcillas o la materia orgánica, originando cambios redox que inducen la transformación arsenito-arsenato, la reducción y metilación del As y la biosíntesis de compuestos de As.

En Argentina, el origen del As en las aguas subterráneas es atribuido principalmente a causas naturales como la actividad volcánica y la actividad hidrotermal ocurrida en la Cordillera de los Andes. Se han encontrado altos niveles en las provincias de Córdoba, Tucumán, Santa Fe, La Pampa, Santiago del Estero, Salta, Chaco, Formosa, Jujuy y Salta. También se detectó la presencia de As en cuencas aluviales pequeñas en la región andina de las provincias de Mendoza, San Luis, San Juan, La Rioja, Catamarca y Chubut (Bundschuh y col., 2012). Si bien diversas fuentes de aguas naturales de Argentina han sido exhaustivamente estudiadas, la información sobre los niveles de As en Patagonia es particularmente escasa (Alvarez y Carol, 2019). La dispersión a través de aguas superficiales y subterráneas ha sido el mecanismo dominante que ha llevado al As hasta la costa atlántica (Swiecky, 2006).

La concentración natural de As en el agua de mar oscila entre 1 y 2 $\mu\text{g/L}$. Las fuentes incluyen erupción volcánica, aguas termales, deposición atmosférica a través de la volatilización a baja temperatura, rocío marino, entrada fluvial, géiseres y fluidos hidrotermales marinos de las crestas oceánicas activas (Kalia y Khambholja, 2015). El As puede tomar cuatro valencias (+5, +3, 0, -3) en el agua de mar. El arsenato (As^{+5}) y arsenito (As^{+3}) son las formas inorgánicas dominantes en el medio marino, mientras que las formas orgánicas dominantes son el ácido monometilarsónico y el ácido dimetilarsónico (Yusof y col., 1994).

Los organismos marinos bioacumulan As desde el agua, fundamentalmente en las formas orgánicas no tóxicas que contienen residuos arsenicales que van desde < 1 a 100 mg/kg, los cuales se encuentran como arsenoazúcares (en las algas) o arsenobetaina (en invertebrados y peces) (Phillips, 1990). No hay evidencias de que se biomagnifique a través de la cadena trófica (Fattorini y col., 2006; Neff, 2002a). La toxicidad del As puede atribuirse generalmente a las alteraciones en el equilibrio homeostático celular entre el estado prooxidante y antioxidante, lo que conlleva un estrés oxidativo en los organismos (Bonetto y col., 2014).

Los organismos muestran diferente sensibilidad a las distintas especies arsenicales (Phillips, 1990), siendo los compuestos de As trivalentes (AsIII) más tóxicos que los pentavalentes (AsV). Por ejemplo, tanto AsIII como AsV afectan el crecimiento del fitoplancton y perifiton marino y algunos de estos impactos parecen ocurrir en concentraciones cercanas a las que se encuentran en el agua de mar, particularmente cuando los niveles ambientales de fosfato son bajos (Kalia y Khambholja, 2015). No obstante, algunas formas orgánicas solubles metiladas del As que contienen grupos metilo o fenilo (por ejemplo, el ácido monometilarsónico y el ácido dimetilarsónico) también son tóxicas y pueden producir efectos adversos comparables a los producidos por el As inorgánico (Fattorini y col., 2006).

Si bien algunos organismos son capaces de transformar As inorgánico en formas orgánicas menos tóxicas, los efectos inducidos por este metaloide varían con las características ambientales del agua de mar (Zhang y col., 2015). Esto se ha demostrado en experiencias con diferentes salinidades en la almeja *Ruditapes philippinarum* (Velez y col., 2016) y en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Coppola y col., 2018).

Debido a la diferente toxicidad que presentan sus especies químicas, resulta necesario conocer la distribución de dichas especies en los distintos compartimentos medioambientales. Por otro lado, determinados suelos constituyen una fuente natural de As, así como un importante medio de retención, acumulación y transformación, pudiendo causar efectos tóxicos en los productores primarios o acumularse en ellos, entrando de esta manera en la cadena trófica (Salgado, 2013).

La intoxicación crónica por As en humanos produce anorexia acompañada de alteraciones gastrointestinales, neuritis periférica, conjuntivitis y lesiones de la piel que incluyen hiperqueratosis y melanosis. Este oscurecimiento de la piel es característico de una exposición prolongada a As y puede ser un factor en el desarrollo de cáncer de piel (Mandal, 2015). Debido a la evidencia de los efectos adversos del As sobre la salud, el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) ha incluido al As dentro del grupo de potenciales agentes cancerígenos (International Agency for Research on Cancer, 2012), así como la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA, por sus siglas en inglés) lo clasifica dentro del grupo A.

La Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) y el Código Alimentario Argentino (CAA) recomienda como límite tolerable una concentración por debajo de 10 µg/L de As para agua de consumo humano (CAA, 2012; WHO, 2011). En cuanto al As en alimentos, la Autoridad Europea sobre Seguridad Alimentaria (EFSA - por sus siglas en inglés-, 2009) concluyó que la Ingesta Semanal Tolerable Provisional (PTWI, por sus siglas en inglés) de 15 µg/kg peso corporal establecida por ese organismo en 1989 ya no era apropiada para proteger la salud (EFSA, 2009). Dicha conclusión se fundamentó en el hecho que el Límite Inferior de Confianza de la Dosis de Referencia (BMDL, por sus siglas en inglés) para la incidencia de cáncer de pulmón, estaba en el mismo rango de la PTWI, la que fue retirada, adoptando el enfoque del margen de exposición. En el mismo sentido, el Comité Mixto WHO/FAO en 2011 coincidió en que era necesario recopilar datos de As y sus especies químicas en alimentos para refinar el cálculo de exposición. Se indicó además la necesidad de trabajar en la validación de métodos de análisis para la especiación del As, así como de incorporar medidas apropiadas para evaluar la exposición total al As inorgánico en los estudios epidemiológicos, incluyendo el aporte de los alimentos y del agua usada en el cocinado y en el procesado de alimentos.

El As que se encuentra en los mariscos está presente en una forma relativamente no tóxica en comparación con el As inorgánico, encontrándose en formas orgánicas en muchos productos marinos (La Porte, 2005). En España existen limitaciones del contenido de As total en varios alimentos que oscilan entre 0,1 mg/L (cerveza, caramelo, goma de mascar, grasas animales y vegetales y aceites vegetales) y 10 mg/L (sucedáneos de café), no existiendo una limitación en pescados. En Australia existe una limitación del nivel de As inorgánico permitido en pescados de 1 mg/kg en peso fresco (Eusko Jaurlaritza - Gobierno Vasco., 2000). En Argentina, se tolera la presencia de hasta 1 mg/kg en los alimentos en general (azúcar blanco, grasas refinadas, jarabe de uva o glucosa y chocolate, entre otros), así como también en tejidos de moluscos cefalópodos y bivalvos (CAA, 2012). Sin embargo, hay que destacar que el consumo de este último tipo de alimentos en Argentina es relativamente bajo respecto a otros países (5 kg comparado con los 20 kg reportados en España), por lo que sería necesario evaluar el riesgo real en función de la dieta de la población argentina.

1.3. CADMIO

1.3.1. Generalidades

El cadmio (Cd) es un metal poco abundante en la naturaleza y uno de los contaminantes metálicos más peligrosos debido a su elevada toxicidad y por su capacidad de acumulación en la cadena alimentaria. Se encuentra en forma de sulfuro y óxido asociado a depósitos minerales de Zn, Pb y Cu y en la roca de fosfato que se extrae para ser utilizada como fertilizante. Es liberado al ambiente por la quema de combustibles fósiles, como carbón y petróleo, los incendios forestales y también durante el refinado de Zn, Pb y Cu (Saldívar y col., 1997, López Tévez, 2016). En cuanto a las fuentes antropogénicas, se encuentran su utilización en la galvanoplastia, la estabilización del PVC, la fabricación de pigmentos para esmaltes y de pilas de Ni-Cd, producto de la obtención de diferentes aleaciones (McGeer y col., 2011).

En los últimos años las emisiones de Cd al medio marino han aumentado, debido a su mayor producción comercial y al incremento de sus aplicaciones (Fernández Galindo, 2012). Se ha estimado que el 99 % del Cd presente en las aguas superficiales (1 m de profundidad) está relacionado con procesos físicos, tales como surgencia y advección, y solo 1% a fuentes antropogénicas (Segovia-Zavala y col., 1998). La forma dominante y

más biodisponible del Cd en el mar es como ion libre (Cd^{+2}). Los complejos orgánicos de Cd constituyen una parte significativa del Cd disuelto, aunque menos biodisponibles que sus formas inorgánicas (Neff, 2002b). Además, existe una fuerte asociación de la distribución vertical del Cd con la de los nutrientes inorgánicos, principalmente fosfato y nitrato, lo que sugiere que la biogeoquímica oceánica de este metal está controlada por el ciclo de la materia orgánica (Bruland, 1983). Los procesos naturales, como la erosión, movilizan grandes cantidades de Cd a los océanos, cuyo contenido es de alrededor de 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Los sedimentos cercanos a las áreas de alta actividad humana pueden contener concentraciones muy elevadas, asociadas a la descarga de desechos biológicos (Saldívar y col., 1997). En las costas patagónicas, la fuente de Cd no está determinada, aunque se ha considerado mayoritariamente natural (Gil y col., 2006).

El Cd es un metal muy soluble en ambientes oxidados permaneciendo en la fase acuosa, con mayor disponibilidad para la biota. Su capacidad de adsorción a las partículas disminuye al aumentar la salinidad, debido a la complejación del cloruro.

Debido a su similitud con el metal esencial Zn, las plantas absorben el Cd del agua de riego, por esto, el empleo de fertilizantes a base de fosfatos que contienen Cd en forma iónica como contaminante natural, o su presencia en el lecho de ríos y mares contaminados por las descargas industriales aumentan los niveles del elemento en los suelos y, por lo tanto, en las plantas (Saldívar y col., 1997).

Pempkowiak y col., (1999) mostraron que los moluscos bivalvos bioacumulan el Cd y otros metales principalmente de las fracciones de sedimentos adsorbidas (intercambiables) y reducibles de óxido de Fe/Mn. El Cd disuelto es adsorbido por la capa de moco en las branquias y el manto y luego es movido hacia la boca por acción ciliar (Engel y Fowler, 1979). El Cd particulado y otros metales pueden ser una fuente importante de metales en el tejido de los invertebrados y peces que se alimentan por filtración. Otra fuente importante de este metal en los bivalvos es la incorporación a través de la dieta, principalmente por el consumo de fitoplancton. El Cd tiende a acumularse preferentemente en el hígado, la glándula digestiva y el riñón, probablemente secuestrado en gránulos insolubles o unidos a proteínas tisulares, como las metalotioneínas (Neff, 2002b). Las concentraciones de Cd en el hígado o la glándula digestiva son aproximadamente 10 veces más altas que las concentraciones en los músculos.

Los bivalvos se utilizan ampliamente en todo el mundo para monitorear la contaminación de los ambientes costeros. Se han observado altas concentraciones de Cd en moluscos, particularmente en caracoles, vieiras y ostras. Los pectínidos parecen acumular Cd en mayor grado que otros organismos (Liu y col., 2012; Metian y col., 2007; Viarengo y col., 1993), lo que indicaría la ausencia de un mecanismo efectivo para regular las concentraciones del mismo. Las concentraciones de metales traza pueden estar influenciadas por muchos factores intrínsecos como la especie, la edad, el sexo y el estado reproductivo y extrínsecos como la temperatura, la salinidad, la disponibilidad de alimento, entre otros (Bryant y col., 1985; Marsden y Cranford, 2016). Las vieiras, incluso de áreas remotas como la Antártida, pueden contener altas concentraciones de Cd que podría provenir de surgencias del Océano Austral (Viarengo y col., 1993). Las vieiras antárticas *Adamussium colbecki* contienen hasta 100 µg/g de peso seco de Cd en su glándula digestiva y entre 1 y 10 µg/g en sus branquias, gónadas y músculos (Bargagli y col., 1996).

En el Reglamento de la Unión Europea se establecen límites máximos de Cd para distintos alimentos que oscilan entre 0,01 mg/kg (vino) y 2 mg/kg (moluscos y centellón). La legislación española establece límites que oscilan entre 0,5 mg/kg (sal común) y 1 mg/kg (pescados y productos de la acuicultura: moluscos bivalvos y gasterópodos, crustáceos y cefalópodos) (Comisión Europea, 2008). La Resolución MERCOSUR N° 116/2012 y 365/2012 sobre contaminantes inorgánicos que fue incorporada al CAA establece para pescado y sus derivados un límite máximo en peso fresco de 0,05 y 2 µg/g para moluscos cefalópodos y bivalvos, respectivamente (CAA, 2012).

Respecto al consumo tolerable de Cd, el Comité Mixto WHO-FAO (WHO/FAO, 2011) establece una ingesta semanal tolerable provisional (ISTP) de 7 µg/kg/semana de Cd. La exposición al Cd puede conducir al desequilibrio de Zn, Mg y Cu en el cuerpo y a menudo se correlaciona con diversos problemas de salud, como insuficiencia renal, trastornos osteológicos, trastornos neurológicos, anosmia, problemas en el sistema de reproducción masculina e incluso cáncer (Zhang y Reynolds, 2019). Los compuestos de Cd han sido clasificados por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC) como probablemente cancerígenos (Grupo 2A) (International Agency for Research on Cancer, 2012) y en 1977 la US EPA lo incorporó a la lista de los 126 contaminantes prioritarios (López Tévez, 2016).

1.4. TOXICIDAD DEL ARSÉNICO Y CADMIO Y SISTEMAS DE DEFENSA

1.4.1. Mecanismos de toxicidad del arsénico y cadmio

En el medio acuático los distintos contaminantes químicos pueden: i) acumularse en el sedimento, ii) distribuirse en la columna de agua, o iii) ser acumulados por los organismos, donde pueden ser inmovilizados y acumulados a largo plazo, metabolizados o excretados. Una vez en su interior, los contaminantes químicos pueden producir efectos tóxicos sobre éstos, bien de forma directa o indirectamente, tras su biotransformación (Fernández Galindo y col., 2010).

El As es una pequeña molécula que puede entrar fácilmente a las células y provocarle daños e incluso la muerte por múltiples mecanismos. Su alta toxicidad se puede explicar porque interfiere directamente con la respiración celular. Los arsenitos pueden fijarse a las proteínas, mientras que el arsenato afecta a la fosforilización oxidativa en relación con el Ciclo de Krebs. Los efectos tóxicos del As incluyen la desnaturalización de enzimas a través de la interacción con los grupos sulfhidrilo, daño celular por la generación de especies reactivas, alteración de la regulación de genes, y generación de cáncer (Hughes y col., 2011).

El Cd posee afinidad por las membranas biológicas, pudiendo ingresar a las células por transporte facilitado y se une a varias biomoléculas afectando la función del sistema de membrana. El Cd^{2+} presenta una alta afinidad por los sitios de unión de Ca^{2+} en la ATPasa generando una competencia directa entre estos cationes presumiblemente debido a las similitudes en la carga y el tamaño de estos iones (Verboost y col., 1987). La toxicidad aguda de Cd^{+2} implica también la interrupción de la homeostasis del Na y del Mg.

1.4.2. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante

Los metales(oides) pueden catalizar la formación de especies reactivas (ER) que pueden dañar las proteínas, los lípidos y el ADN (Rank y col., 2007), causando lesiones celulares o la muerte celular. Los radicales libres son especies químicas que contienen un electrón desapareado en sus orbitales de valencia externos dentro de su estructura. Estas especies químicas pueden ser átomos (como el H y Cl), un metal de transición o una molécula (Radi, 2018). Pueden estar centrados en átomos de O_2 , como el radical hidroxilo (HO^\bullet) y el anión superóxido (O_2^-), que junto al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ozono

(O_3) y el oxígeno singulete (1O_2) conforman las especies reactivas del oxígeno (ERO). Estas especies son intermediarios parciales de la reducción parcial del O_2 a H_2O (Bonetto, 2019) (**Fig. 1**). Los metales(oides) afectan la fidelidad de la replicación porque inhiben enzimas involucradas en la replicación, inhiben la síntesis de nucleótidos, alteran los procesos de metilación del ADN y de los componentes del complejo de replicación del ADN. Estos cambios pueden modificar la expresión génica, aunque no haya cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN (López Tévez, 2016).

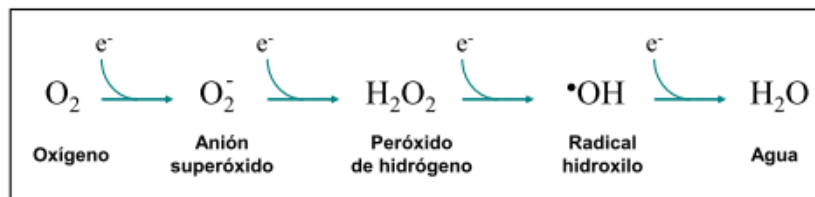


Fig. 1. Intermediarios en la reducción parcial del O_2 . Tomado de Bonetto, 2019

Existen diferentes mecanismos de protección celular para evitar o disminuir el daño oxidativo que pueden ocasionar las especies reactivas, incluida la actividad de enzimas antioxidantes (como superóxido dismutasa - **SOD**, catalasa - **CAT** y glutatión S-transferasa - **GST**), antioxidantes no enzimáticos (como el α -Tocoferol - **α -T**) y la inducción de la expresión de metalotioneínas (**MT**) (Quinn y col., 2005) (**Fig. 2**).

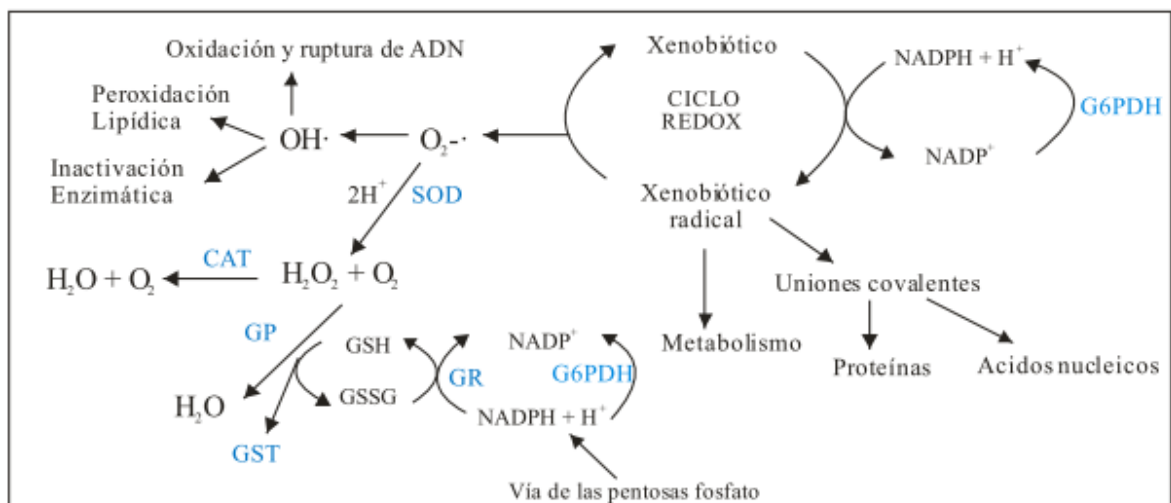
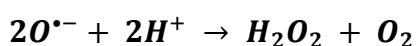


Fig. 2. Consecuencias toxicológicas del ataque de los radicales libres y principales defensas antioxidantes enzimáticas. Tomada de Fernández Galindo (2012).

1.4.3. Enzimas antioxidantes

Los antioxidantes previenen la oxidación y corrigen las deficiencias antioxidantes dentro del cuerpo, entre los cuales se encuentran enzimas como SOD, CAT y GST, entre otras (Alexander y col., 2019).

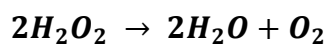
La enzima SOD destruye el anión superóxido al dismutarlo en peróxido de hidrógeno y oxígeno de acuerdo a la reacción 1:



(Reacción 1)

El radical superóxido se genera en múltiples procesos metabólicos como la oxidación de moléculas endógenas y metales(oides), actividad de oxidasas y deshidrogenasas, cadena de transporte electrónico, ciclos redox, y metabolismo de xenobióticos como metales(oides) de transición (McCord y Fridovich, 1969).

La CAT es una hemoproteína de cuatro subunidades y participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno de acuerdo a la reacción 2:



(Reacción 2)

La CAT es una enzima fundamental, ya que el peróxido de hidrógeno es una especie reactiva peligrosa debido a su toxicidad directa e indirecta como precursor del radical hidroxilo, la especie más reactiva del oxígeno. La CAT ha sido ampliamente empleada como biomarcador de contaminación, habiéndose demostrado el incremento de sus niveles de exposición a compuestos orgánicos y metales(oides) (Valavanidis y col., 2006).

Las enzimas GSTs son un grupo de enzimas ampliamente distribuido que cataliza la conjugación de moléculas orgánicas que poseen un centro electrofílico reactivo con el grupo tiol del tripéptido glutatión (Mardirosian, 2015). El efecto de esta reacción, generalmente, es convertir una molécula lipofílica reactiva en una soluble en agua mediante la formación de un conjugado no reactivo que puede ser excretado. Las GSTs cumplen un papel esencial en la protección de los organismos contra el daño peroxidativo,

en el transporte celular y en la detoxificación tanto de compuestos endógenos como de xenobióticos reactivos (Habig y col., 1974). Diversos estudios han observado la inducción de las GSTs por exposición a metales(oides), lo que ha apoyado su uso como biomarcador de contaminación (Benali y col., 2015; Moreira y Guilhermino, 2005; Myrnes y Nilsen, 2007; Viarengo y col., 1995).

1.4.4. Metalotioneínas

Las metalotioneínas (MT) constituyen una familia de proteínas de bajo peso molecular con elevado contenido en cisteína (30-35%) y marcada capacidad para combinarse con iones metálicos. Dentro del metabolismo celular, se le han asignado múltiples funciones como un papel central en la homeostasis celular de ciertos metales esenciales (transporte y almacenamiento), la detoxificación de metales no esenciales y esenciales que se encuentran en alta concentración, participación en ciertos procesos inflamatorios y la inactivación de radicales libres (Brambila y Lozano, 1999). La variación en el nivel de MT es indicadora de exposición a xenobióticos, de situaciones ambientales adversas, así como de situaciones de estrés fisiológico.

1.4.5. α -Tocoferol

Dentro de los antioxidantes químicos de bajo peso molecular se encuentran compuestos tales como los tocoferoles (vitamina E). De los cuatro pares de homólogos de los tocoferoles, la forma α es la que tiene la mayor capacidad antioxidante en los tejidos biológicos (Burton y Ingold, 1981). El α -T es un compuesto muy importante para el funcionamiento celular ya que mantiene la integridad de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga presentes en las membranas celulares al atrapar radicales libres como el radical peroxilo (ROO \bullet) (Desai, 1984). Estos compuestos son sintetizados por plantas y algas, hongos y cianobacterias, mientras que el resto de los organismos los deben incorporar desde la dieta (de Carvalho y Caramujo, 2017).

1.4.6. Lipoperoxidación

La peroxidación lipídica o lipoperoxidación (LPO) es un proceso complejo que implica la formación y propagación de radicales lipídicos, la captación de oxígeno, un

reordenamiento de los dobles enlaces en los lípidos insaturados y la eventual destrucción de los lípidos de la membrana, con la producción de una variedad de productos de degradación, incluidos alcoholes, cetonas, alcanos, aldehídos y éteres (Barrera y col., 2008). Esto desestabiliza la estructura y función de la célula y sus organelas, pudiendo conducir a la muerte celular (apoptosis) (Barrera-Escorcia y Wong-chang, 2010). El mecanismo de LPO incluye una fase inicial, una fase de propagación de la reacción en cadena de los radicales libres y una fase de terminación. En las reacciones de iniciación se produce la interacción entre el O_2 y lípidos de cadena larga resultando en la sustracción de un átomo de hidrógeno. Esta reacción ocurre relativamente fácil ya que necesita una baja energía de disociación. Las reacciones de propagación involucran la reacción de O_2 con radicales centrados en carbono para formar hidroperóxidos de lípidos. Los metales de transición promueven la peroxidación lipídica de dos maneras: (1) catalizando la formación de especies de radicales libres de oxígeno y (2) catalizando la descomposición de hidroperóxidos en radicales alquilo (R^\bullet) y ROO^\bullet que propagan la LPO (Rikans y Hornbrook, 1997). La etapa de terminación implica la reacción de dos radicales hidroperoxilo para formar productos no radicales (Bonetto, 2019; Repetto y col., 2012).

La LPO puede ser estimada a través del contenido de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y radicales lipídicos (RL^\bullet) y, el equilibrio entre el daño de los radicales libres y la protección antioxidante en la fase lipídica, se puede evaluar mediante las relaciones $RL^\bullet/\alpha\text{-T}$ y $TBARS/\alpha\text{-T}$. Este índice asume que los niveles más altos de biomarcadores indican más daño a los tejidos (Lattuca y col., 2009).

1.4.7. Índice de respuesta integrada de biomarcadores (IBR)

En las últimas décadas, la ecotoxicología ha desarrollado un nuevo enfoque metodológico basado en la medición de las respuestas bioquímicas, celulares, fisiológicas o comportamentales que pueden ser medidas en un organismo, a nivel de población o en una comunidad y sean reflejadas frente a un peligro potencial por uno o más contaminantes (Toro-Restrepo, 2011). En un estudio ambiental, cada una de estas respuestas o biomarcadores, representa en sí misma una señal integrada del nivel de contaminación de una determinada zona y, por consiguiente, constituye un indicador del nivel de riesgo toxicológico al que puede ser sometida una determinada población natural (Benedetti y col., 2015; Regoli y Giuliani, 2014; Viarengo y col., 1995; Widdows y col., 1981).

Sin embargo, la aplicación exitosa de este enfoque es limitada, ya que la interpretación de los resultados obtenidos a partir de una batería de biomarcadores, cada uno con sus respectivas fluctuaciones espacial y temporal, puede resultar extremadamente engorrosa si no se logra una integración adecuada. Para abordar este problema, se han desarrollado los llamados *índices de respuesta integrada de biomarcadores* (IBR, por sus siglas en inglés *Integrated Biomarker Response Index*). Un IBR es un índice que resulta de la combinación matemática de la respuesta de varios biomarcadores en un único valor, teniendo en cuenta diferentes escenarios posibles, tales como sitios, épocas o tratamientos ensayados (Diodato, 2013). Específicamente, el cálculo se basa en las diferencias relativas entre los biomarcadores seleccionados en cada set de datos. Así, es calculado como la suma de las áreas de un gráfico radial (un método simple multivariado) por cada dos biomarcadores vecinos (Ver Sección 2.7.3).

Disponer de un único valor que represente el estrés inducido por contaminantes en el estado de salud de los organismos, así como su distribución espacial y/o temporal en un área de estudio, o su fluctuación según diferentes tratamientos, no solo facilita la interpretación de los resultados sino que además se transforma en una potencial herramienta de manejo (Cravo y col., 2012). De esta manera, en un estudio ambiental es posible clasificar los sitios de muestreo según los gradientes de contaminación (Beliaeff y Burgeot, 2002; Serafim y col., 2012) y obtener señales de alerta temprana en la salud de los animales al evaluar los efectos biológicos de fuentes difusas de contaminantes (Van Der Oost y col., 1996).

1.5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivos

Objetivo general

Estudiar la acumulación de As y Cd y sus efectos bioquímicos sobre la vieira *Aequipecten tehuelchus* del GSJ.

Hipótesis

La exposición en acuarios experimentales de las vieiras *A. tehuelchus* del golfo San José (GSJ) a concentraciones de As y Cd por encima de las naturales, conduce a una situación de estrés que induce la generación de especies reactivas, respuestas antioxidantes y daño oxidativo.

Objetivos específicos

1. Evaluar los niveles de As y Cd en agua y sedimentos del GSJ en verano e invierno.

Hipótesis

Los niveles de As y Cd en agua y sedimento del GSJ varían estacional y espacialmente.

2. Evaluar las concentraciones de As y Cd y una serie de biomarcadores bioquímicos en órganos de la vieira *A. tehuelchus* del GSJ en verano e invierno.

Hipótesis

Los niveles de biomarcadores bioquímicos en órganos de la vieira *A. tehuelchus* del GSJ varían como respuesta a los cambios de las concentraciones ambientales de As y Cd.

3. Determinar experimentalmente la CL₅₀ mediante bioensayos independientes de exposición de la vieira *A. tehuelchus* a distintas concentraciones de As y de Cd por 96 horas.

Hipótesis

La vieira *A. tehuelchus* tiene una sensibilidad diferente para cada elemento que se verá reflejado en disímiles valores de CL₅₀.

4. Evaluar experimentalmente mediante bioensayos independientes de corto y largo plazo la respuesta de una serie de biomarcadores bioquímicos de la vieira *A. tehuelchus* expuesta a una concentración subletal de As y Cd.

Hipótesis

Los niveles de biomarcadores bioquímicos en órganos de la vieira *A. tehuelchus* del GSJ varían ante la presencia de As y Cd con el fin de evitar y/o mitigar sus potenciales efectos adversos.

1.6. ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

En función de los objetivos específicos propuestos, la presente tesis fue estructurada de la siguiente manera:

Capítulo 1. Introducción general: se aborda el marco teórico con el fin de contextualizar la problemática. Dado que los temas están estrechamente relacionados, se realizó una única introducción que abarca el marco teórico para el resto de los capítulos.

Capítulo 2. Metodología: se detallan los métodos utilizados para la toma de muestras, la caracterización ambiental y los ensayos toxicológicos. Esta metodología es la empleada para abordar todos los objetivos específicos y, por lo tanto, se comparte para todos los capítulos siguientes.

Capítulo 3. Resultados y discusión: caracterización ambiental. En este capítulo se presentan y se discuten los resultados correspondientes a los objetivos específicos 1 y 2. Este capítulo fue publicado en la revista Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2019. DOI: 10.1007/s00244-019-00690-1.

Capítulo 4. Resultados y discusión: efectos letales y subletales de arsénico en *Aequipecten tehuelchus*. En este capítulo se presentan los resultados de las experiencias letales y subletales con As y la discusión general de los mismos. Esta sección aborda parte de los objetivos específicos 3 y 4.

Capítulo 5. Resultados y discusión: efectos letales y subletales de cadmio en *Aequipecten tehuelchus*. En este capítulo se presentan los resultados de las experiencias letales y subletales con Cd y la discusión general de los mismos. Esta sección aborda parte de los objetivos específicos 3 y 4.

Capítulo 6. Conclusiones.

2. METODOLOGÍA

CAPÍTULO 2. Metodología

2.1. ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio se encuentra en el GSJ, ubicado en el norte de la Península Valdés (PV). Este golfo se divide longitudinalmente en dos dominios hidrográficos (este y oeste), cada uno con un patrón de circulación de agua diferente. El dominio oeste es más turbulento que el dominio este y tiene un bajo intercambio de agua y temperatura constante durante la mayor parte del año. Por lo contrario, el dominio este presenta menor circulación de agua y la temperatura responde rápidamente a las variaciones de la temperatura atmosférica, con la estratificación del agua durante el verano y la mezcla vertical durante el invierno (Amoroso y col., 2011). En las costas de este golfo la población humana asentada es prácticamente nula, por lo que la influencia antrópica sobre este ecosistema es escasa y está limitada a la actividad marisquera artesanal (Ciocco y col., 1998; Pascual y Zampatti, 1998). Dentro del GSJ se seleccionaron dos sitios de muestreo: San Román (SR) y El Riacho (R) (**Fig. 3**). San Román está ubicado en la costa noreste del golfo (dominio este), mientras que El Riacho se halla al sudoeste (dominio oeste).

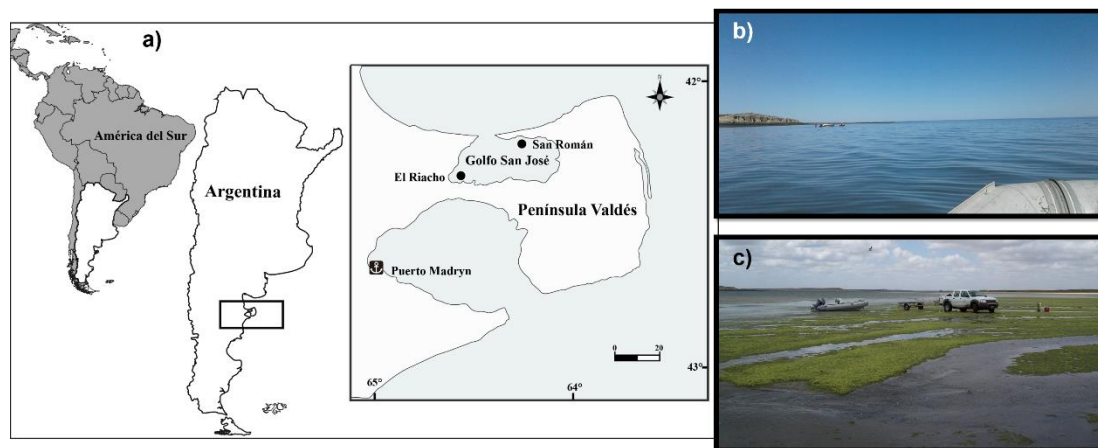


Fig. 3. a) Ubicación de los sitios de estudio San Román (b) y El Riacho (c) en el golfo San José en Patagonia, Argentina.

2.2. ORGANISMO DE ESTUDIO

Se utilizó la vieira tehuelche, *Aequipecten tehuelchus* (**Fig. 4 a**) proveniente del GSJ como organismo de estudio. Se seleccionaron aquellos organismos con talla comprendida entre los 55 y 65 mm de largo. Para realizar los análisis de As, Cd y biomarcadores, se seleccionaron las branquias (Br), la glándula digestiva (GD) y el músculo (Mu) teniendo en cuenta las funciones de cada uno y la posible interacción que tendrían con los contaminantes. Las branquias son el primer tejido de contacto con los elementos tóxicos en el agua dado el hábito filtrador, la glándula digestiva es un órgano de acumulación y detoxificación y el músculo es un potencial tejido de acumulación. Además, es de relevante importancia conocer la acumulación en el músculo dado que es el principal tejido comercializado y consumido.

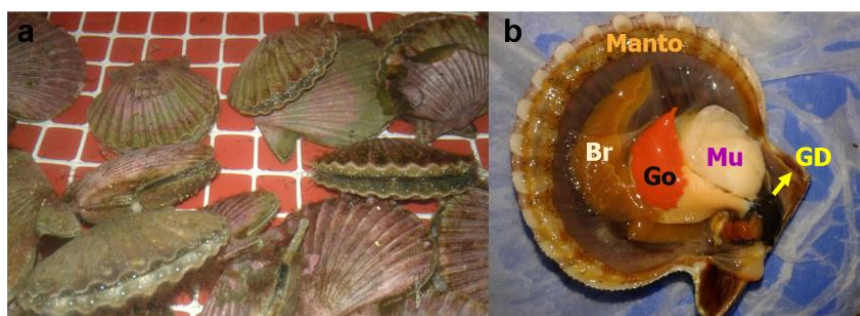


Fig. 4. *Vieira tehuelche*, *Aequipecten tehuelchus*, en acuarios experimentales (a). Vista interna de *A. tehuelchus* (b). Br = branquias. GD = glándula digestiva. Mu = músculo. Go = gónada.

2.3. CARACTERIZACIÓN AMBIENTAL

En cada sitio de muestreo, se midió *in situ* en el agua temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, pH y sólidos totales disueltos con sonda multiparámetro YSI 556. Con el fin de determinar los niveles actuales de As y Cd en las distintas matrices (agua, sedimentos y organismos) y de los biomarcadores en los tejidos de la vieira tehuelche, se tomaron muestras en ambos sitios de estudio en invierno (agosto 2015) y verano (enero 2016) mediante buceo autónomo. En las zonas aledañas a los bancos de vieiras, se colectaron 3 muestras de agua en botellas plásticas de 500 mL previamente acondicionadas y 12 muestras de sedimento superficial (hasta 5 cm de profundidad) utilizando corers de plástico de 4,5 cm de diámetro y 25 cm de largo. Se obtuvieron 3 muestras compuestas de 4 corers cada una y se colocaron en bolsas de plástico. Se recolectaron 9 organismos de cada sitio y estación para realizar el análisis de As y Cd. Todas las muestras fueron

trasladadas al laboratorio en frío y al resguardo de la luz. Una vez en el laboratorio, las muestras de agua fueron almacenadas en heladera y las de sedimento y organismos se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el acondicionamiento para el análisis de As y Cd. Los organismos que se utilizaron para el análisis de biomarcadores fueron rápidamente dispuestos en acuarios con agua de mar del sitio, aireación constante y temperatura controlada durante 24 h con el fin de disminuir el estrés producido durante su traslado y manipulación. Una vez transcurrido el tiempo de aclimatación, los organismos fueron diseccionados y almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en ultrafreezer hasta el análisis de los biomarcadores.

2.4. ENSAYOS TOXICOLÓGICOS

2.4.1. Recolección y aclimatación de los organismos

Con el objetivo de evaluar los efectos de la exposición a As y Cd en las vieiras, se realizaron ensayos toxicológicos en el Acuario Experimental del CCT CONICET-CENPAT. Se seleccionó el sitio de San Román dada la disponibilidad del recurso y la alta actividad de marisqueería artesanal observada durante las campañas previas. Además, los ensayos se realizaron en el invierno a fin de evitar el estrés producido durante el desove que tiene lugar durante el verano. Para ello, se colectaron 400 organismos en San Román en agosto de 2016 y 2017 y se trasladaron en conservadoras con frío hacia el Acuario Experimental. Los mismos se aclimataron por una semana en 6 acuarios de 30 L de capacidad ($n = 40$ por acuario) con aireación constante, agua de mar limpia, filtrada por tamices de 10, 5 y $1\text{ }\mu\text{m}$ con acoplamiento de desinfección por UV y condiciones similares a las naturales de temperatura ($13,0 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$), salinidad ($35 \pm 1\text{ g/L}$) y fotoperiodo (12:12). Cada 24 horas se removieron los restos fecales mediante sifón y cada 48 horas se realizaron recambios de 50 % del agua. Durante todo el periodo de aclimatación, se registró diariamente la temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad del agua con una sonda multiparámetro YSI 556, peachímetro (Consort C931) y refractómetro (Alla-France 0-100), respectivamente.

2.4.2. Ensayos de letalidad

Para establecer las concentraciones a ensayar en las experiencias de concentración letal media (CL_{50}) a 96 h, se realizó un *ensayo de búsqueda de rango* para cada elemento por separado. Se prepararon soluciones madre de As (1500 mg As/L) y de Cd (0,1 g Cd/L) en agua de mar filtrada utilizando arsenito de sodio ($NaAsO_2$) y cloruro de cadmio ($CdCl_2$), respectivamente. A partir de las mismas, se realizaron exposiciones independientes en soluciones de 10, 25 y 50 mg As/L y 25, 50 y 100 μg Cd/L, preparadas con agua de mar filtrada como se indicó en la etapa de aclimatación y 2 controles con agua sin contaminar (**Fig. 5** y **Fig. 6**).

Un día antes de comenzar el ensayo se prepararon acuarios de 10 L lavados con vinagre diluido (1/10) y al menos 3 enjuagues con agua corriente y otros 3 con agua desionizada. Posteriormente se colocaron 4 individuos en cada acuario conteniendo 5 L de solución de exposición, realizándose cada tratamiento por triplicado. Para asegurar la correcta mezcla se colocó el aireador durante 2 horas antes de incorporar los organismos. Diariamente se registró el número de muertes en cada acuario y se determinó la mortalidad acumulada a las 96 h de exposición.

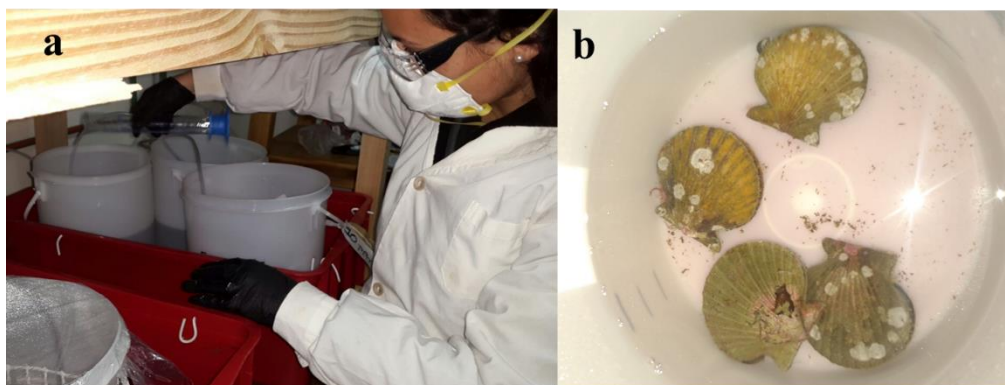


Fig. 5. Adición de solución madre a acuarios con agua de mar (a). *A. tehuelchus* en acuarios con agua de mar contaminada con As (b).

En función de los resultados obtenidos del ensayo de búsqueda de rango se establecieron la mayor y menor concentración a ensayar como aquella que, en 24 h provocara la muerte de al menos 50 % de los individuos y aquella que en 96 h provocara menos del 50 % de muertes, respectivamente. Posteriormente, se calculó el Log_{10} para establecer las concentraciones intermedias para el ensayo de CL_{50} (**Fig. 6**). Se estableció el siguiente rango de concentraciones: 4; 5; 6,3; 7,9 y 10 mg As/L para las experiencias

con As y 25; 50; 100; 150; 204; 275; 371 y 500 $\mu\text{g Cd/L}$ para aquellas con Cd. Además, se realizaron controles con organismos en agua de mar limpia sin ningún aditivo.

Ensayo de búsqueda de rangos

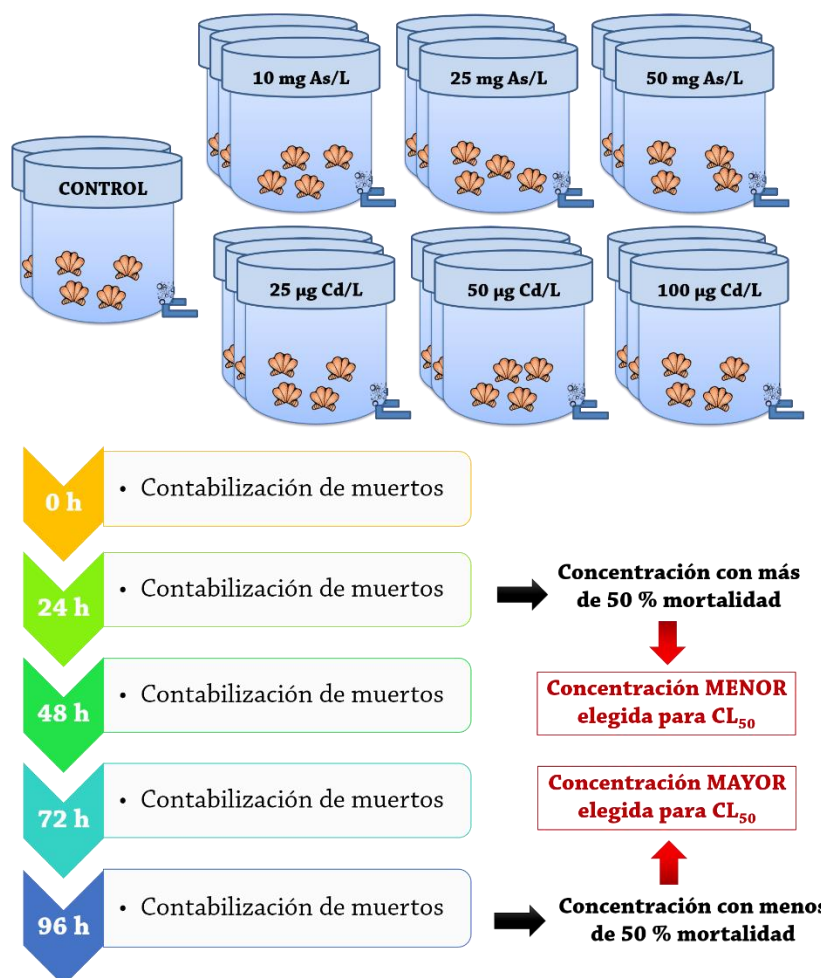


Fig. 6. Esquema del ensayo de búsqueda de rangos para determinar las concentraciones a ensayar en CL_{50} .

El día en que se comenzaron los experimentos se seleccionaron 9 organismos para realizar 3 muestras compuestas para el análisis de As y 3 para el análisis de biomarcadores (“inicial”). En cada acuario se colocaron, 6 individuos en 5 L de agua de mar filtrada con aireación constante, fotoperiodo 12:12, temperatura de $13,0 \pm 1,0$ °C y salinidad de 35 ± 1 g/L (**Fig. 7**). Se registró la mortalidad acumulada durante las 96 h de exposición para determinar la CL_{50} de As y Cd a través del método de análisis Probit (programa Probit-EPA, versión 1.5). Se consideró como muerto aquel organismo que poseía manto y

tentáculos retraídos, manto laxo y/o cerramiento completo de valvas por varias horas al día, o las valvas completamente abiertas y sin respuesta a estímulos mecánicos.

Con aquellos organismos que sobrevivieron a las 96 h se realizaron 3 muestras compuestas (1 por acuario) conformadas por 3 organismos de un mismo acuario para la determinación de As acumulado ($n = 3$), y se tomó un organismo por acuario para la determinación de biomarcadores ($n = 3$). En todos los casos se procedió a la disección según correspondiera al análisis que se llevaría a cabo.

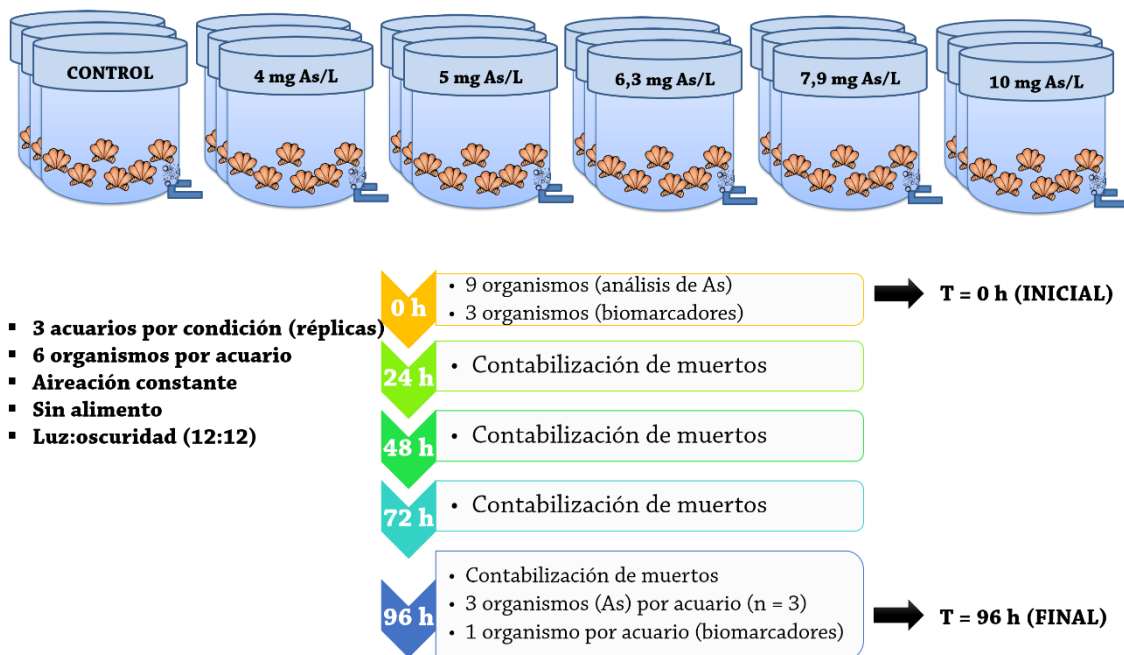


Fig. 7. Esquema ensayo de toxicidad con As para la determinación de la CL_{50} a 96 h de exposición.

Con el fin de evitar pérdidas por evaporación y/o liberación de spray, cada acuario se tapó con un nylon transparente en ambas experiencias. El sistema de experimentación completo se aisló del ambiente de la sala experimental con polietileno de alta densidad como medida de protección del propio sistema para evitar perturbaciones externas y del personal que trabajaba en la sala en otros experimentos. El desarrollo completo de los ensayos se realizó utilizando elementos de protección personal como gafas, guardapolvo, guantes y barbijo. Durante el periodo de exposición no se realizaron recambios de agua.

Una vez finalizadas ambas experiencias, los bivalvos fueron diseccionados para separar los tejidos de interés y cada muestra individual fue almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el análisis de As y Cd y a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el análisis de biomarcadores de estrés oxidativo. El agua contaminada con As y Cd fue descartada según los lineamientos del Comité de Seguridad Laboral y Bioseguridad del CCT CONICET-CENPAT.

2.4.3. Ensayos de subletalidad

Se realizaron ensayos crónicos (14 días de exposición a cada elemento) con el objetivo de evaluar en cada tejido: i) el efecto del tiempo de exposición y ii) el efecto de la concentración del elemento ensayado.

Luego del periodo de aclimatación, 8 vieiras fueron distribuidas aleatoriamente en cada acuario con 7 L de agua de mar filtrada con 125, 500 y 1000 $\mu\text{g As/L}$ y 2, 5 y 12 $\mu\text{g Cd/L}$, además de los respectivos controles sin tóxico. Al igual que en los ensayos letales, se tomaron muestras iniciales de organismos post-aclimatación (9 para determinación de As y 3 para biomarcadores). Los acuarios se mantuvieron con aireación constante, fotoperiodo 12:12, temperatura de $13,0 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y salinidad de $35 \pm 1\text{ g/L}$. Cada tratamiento se realizó por triplicado, se recambió el 50 % del agua a los 4, 8 y 12 días de exposición y no se suministró alimento. A los 7 y a los 14 días de exposición, se diseccionaron inmediatamente las branquias, glándula digestiva y músculo de los individuos de cada tratamiento y se almacenaron individualmente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para los biomarcadores y a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en 3 muestras compuestas de 2 tejidos cada una para evaluar la acumulación de As o Cd, según correspondiese (**Fig. 8**). La condición de ayuno es una potencial causa de estrés. Con el fin de considerar dicha fuente, los organismos expuestos fueron comparados con controles que estaban en la misma condición de inanición.

A lo largo de todos los ensayos, se aplicaron las mismas medidas de protección del sistema y de seguridad de las personas que en los ensayos de letalidad.

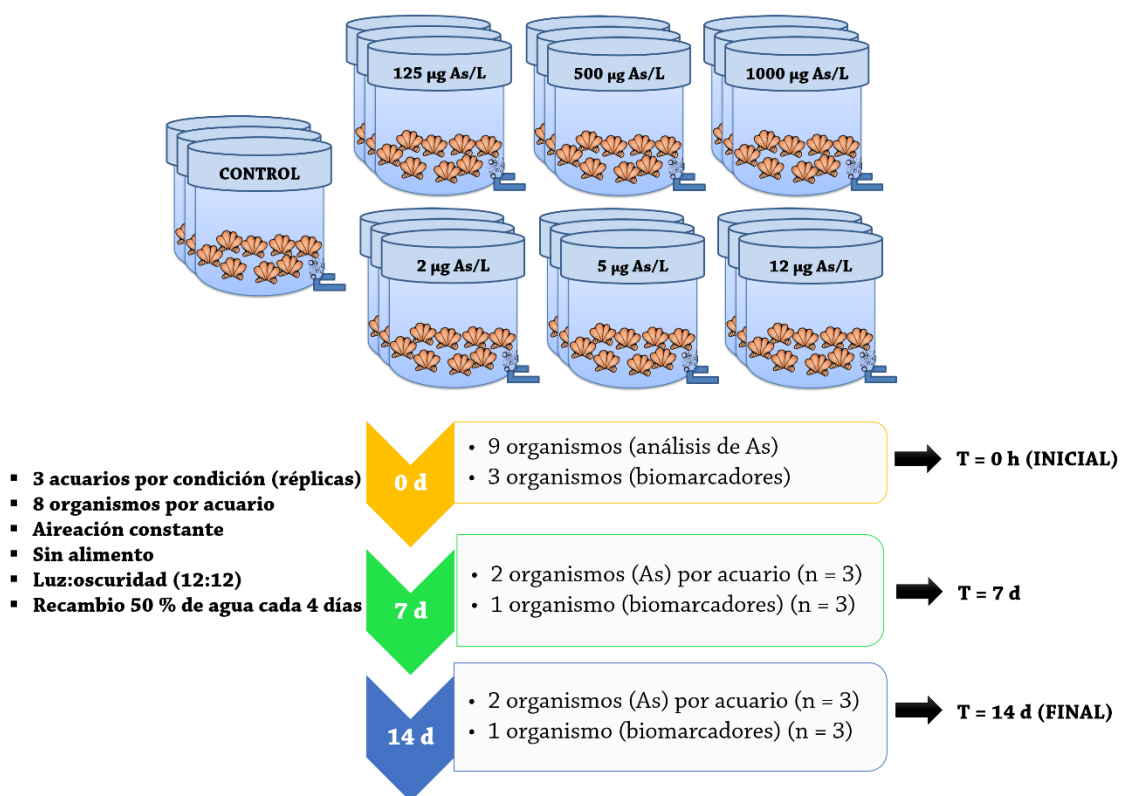


Fig. 8. Esquema ensayo de toxicidad con As y Cd a concentraciones subletales a 7 y 14 días de exposición.

2.5. ANÁLISIS DE ARSÉNICO Y CADMIO EN AGUA, SEDIMENTO Y ORGANISMOS

Las determinaciones de As y Cd en agua de mar se realizaron como servicio a terceros en el Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS), Consejo Nacional de Investigación Científica y Técnica (CONICET), Universidad Nacional del Sur (UNS). La lectura se realizó en un Espectrómetro de Emisión Atómica por Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES) Shimadzu 9000 de alta resolución simultánea según la norma US EPA 2007. Para la determinación de As, se realizó una lectura directa utilizando una antorcha especial para sólidos disueltos (antorcha HTDS, Glass Expansion, Australia) y se utilizó el método de adición de estándar. Para la determinación de Cd, se realizó un tratamiento previo de las muestras siguiendo la metodología del Consejo Nacional de Investigación de Canadá (Sturgeon y col., 1980). Las muestras se tamponaron a pH 5,5 con acetato de amonio 1 N y se transfirieron a viales de decantación de 2 L que contenían 5 g de resina de intercambio iónico Chelex 100. El agregado se agitó durante 1,5 horas y luego comenzó la retención selectiva por goteo (2 mL/min). La desorción de los metales(oides) retenidos en la resina se llevó a cabo utilizando una mezcla de ácido nítrico: ácido clorhídrico (1:1).

Se seleccionaron 36 organismos de entre 75-90 mm de ancho y 65-80 mm de largo. Se realizó la disección de las branquias, la glándula digestiva y el músculo, que se pesaron y se formaron muestras compuestas de cada tejido de 3 individuos de cada sitio y temporada. Además, se realizaron muestras compuestas del tejido blando completo con el fin de evaluar el potencial riesgo a la salud humana debido al consumo. Las muestras de sedimento y tejidos fueron congeladas a -80 °C, liofilizadas durante 96 h y homogeneizadas con un molinillo manual. Se calculó el porcentaje de humedad de cada muestra de tejidos, permitiendo expresar las concentraciones de As y Cd tanto en peso seco como húmedo (éste último necesario para la comparación con valores límites para el consumo y para el cálculo de riesgo para la salud humana). Muestras de 0,5 g se digirieron con ácido nítrico, diluido al 10 % para los sedimentos y puro para los tejidos, en un digestor por microondas NOVAVAVE SA, usando un programa de temperatura de 180 °C durante 10 minutos según el método US EPA 3052 y 3015a, respectivamente (U.S. Environmental Protection Agency, 2007, 1996). Después de la digestión, las muestras se completaron con agua desionizada hasta 50 mL previo al análisis con un Espectrómetro de Emisión Óptica por Plasma de Acoplamiento Inductivo modelo Agilent 720 axial (ICP-AES). Se analizaron 3 réplicas de materiales de referencia certificados de sedimento (PACS-2) y tejido de ostra (NIST-SRM 1566b) para el control de calidad de los datos. La precisión, expresada como coeficiente de variación, fue 5% para As y 4% para Cd. La exactitud, expresada como porcentaje de recuperación, varió entre 89 y 102% y los límites de detección fueron 0,7 para As y 0,25 para Cd en µg/g peso seco (ps).

2.6. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

Para los análisis bioquímicos los organismos se diseccionaron sobre planchas congeladas con el fin de mantener la temperatura lo más baja posible. Inmediatamente realizada la disección, cada órgano fue pesado y almacenado en ultrafreezer a - 80 °C individualmente. Para cada sitio y estación se analizaron los 3 tejidos de 5 organismos individualmente (n = 5 por cada sitio y estación) y, para los ensayos toxicológicos, se realizaron análisis de cada tejido de 3 organismos individualmente por cada tratamiento (n = 3).

2.6.1. Especies reactivas (ER)

La determinación de ER se realizó a través de la oxidación de la 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Las muestras fueron homogeneizadas (1:5 p/v) en solución reguladora Tris-HCl 100 mM, pH 7,75, con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM y cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 5 mM. Los homogeneizados se centrifugaron a 10.000 g durante 20 minutos a 4 °C y el sobrenadante fue removido y empleado en las determinaciones. La reacción se realizó en solución reguladora N-[2-hidroxiethyl]piperazina-N'-[ácido 2-etanosulfónico] (HEPES) 30 mM, pH 7,2 con cloruro de potasio (KCl) 200 mM y $MgCl_2$ 1 mM con el agregado del compuesto fluorescente DCFH-DA, en una concentración final de 40 μ M. Las esterasas presentes en la muestra clivan a la DCFH-DA, así la DCFH resultante no fluorescente es oxidada por especies reactivas al compuesto fluorescente DCF, el cual es detectado fluorométricamente empleando $\lambda_{ex} = 488$ nm y $\lambda_{em} = 525$ nm. La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C y para la medición se utilizó un lector de placas marca Varioskan LUX. El contenido de proteínas fue calculado en cada homogeneizado según Lowry y col., (1951). La velocidad de oxidación de la DCFH-DA se expresó como U/mg proteína min.

2.6.2. Enzimas antioxidantes

Para determinar las actividades enzimáticas, las muestras se homogeneizaron en una proporción 1:3 (p/v) de solución tampón que contenía Tris-Base 20 mM, EDTA 1 mM, DL-ditiotreitol 1 mM, sacarosa 0,5 M, KCl 0,15 M y fluoruro de fenilmetilsulfón 0,1 mM, con un pH ajustado a 7,6 según Bainy y col., (1996). La actividad de SOD se midió mediante la inhibición de la autooxidación de la epinefrina a 480 nm a 30 °C (Misra y Fridovich, 1972). Una unidad de SOD se definió como la cantidad de enzima que inhibe la velocidad de formación de adrenocromos en un 50% en las condiciones del ensayo. La actividad de CAT se evaluó mediante la tasa de descomposición del H_2O_2 a 240 nm en función de actividad de la enzima (Beutler, 1982). Se definió una unidad de CAT como la cantidad de enzima que cataliza la eliminación de 1 mmol de H_2O_2 por minuto. La actividad de GST se determinó incubando GSH con 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno como sustrato a 25 °C y midiendo el aumento de la absorbancia a 340 nm (Habig y col., 1974). Se definió una unidad de GST como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 mmol de 2,4 dinitrofenil-S-glutatiión por minuto. Las proteínas se midieron por el

método de Lowry y col. (1951), con albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Todas las actividades enzimáticas se expresaron en unidades por miligramo de proteínas (U/mg prot.). Las determinaciones se realizaron utilizando un espectrofotómetro Jasco UV/Vis 7850 para SOD y un lector de placas Varikosan Lux para CAT y GST.

2.6.3. Metalotioneínas (MT)

Las MT fueron analizadas según Viarengo y col., (1997). Los tejidos se homogeneizaron (1:3 p/v) en una solución de Tris-HCl 20 mM, pH 8,6, con sacarosa 0,5 M, leupeptina 0,006 mM, PMSF 0,5 mM y 0,01% de β -mercaptoetanol. El homogeneizado se centrifugó a 14.000 g durante 40 minutos a 4 °C y el sobrenadante resultante se usó para una posterior precipitación de etanol/cloroformo en dos etapas (6.000 g durante 10 minutos a 4 °C). Después del fraccionamiento ácido etanol/cloroformo del homogeneizado de tejido, el precipitado resultante conteniendo las MT se resuspendió en tampón Tris-HCl 5 mM con EDTA 1 mM pH 7 seguido de una reacción con 5,5-ditio-2-bis-nitrobenzoato (DTNB). Las MT se cuantificaron mediante el ensayo espectrofotométrico utilizando GSH como estándar y se expresaron como nmol-SH/mg prot. Las determinaciones se realizaron utilizando un espectrofotómetro Jasco UV/Vis 7850 y un lector de placas Varikosan LUX.

2.6.4. Contenido de α -Tocoferol

Para determinar el contenido de α -T se homogeneizaron muestras de 40 mg en 100 μ L de agua desionizada, 15 μ L de hidroxitolueno butilado al 4% (p/v) y 100 μ L de dodecilsulfato de sodio al 3% (p/v). Las muestras se extrajeron con 200 μ L de metanol y 900 μ L de hexano. Después de la centrifugación a 5.000 g durante 5 minutos, se tomaron 800 μ L del sobrenadante y se eliminó el solvente por evaporación bajo una corriente de nitrógeno. Los extractos se disolvieron en metanol:etanol (1:1). Luego de un proceso de filtrado a través de membranas de nylon (0,22 μ m de tamaño de poro) las muestras fueron inyectadas para su análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) de fase reversa con detección electroquímica. Se utilizó un detector amperométrico Bioanalytical System LC-4C aplicando un potencial de oxidación de +0,6 V (Desai, 1984). Las determinaciones se realizaron empleando un equipo de HPLC, bomba Waters 510 con detector UV-Vis Water 486 y detector electroquímico ESA

Coulochem II, con sistema de adquisición de datos computarizado, columna: Supelcosil LC-8 (3,3 cm x 4,6 mm; 3 μ m). El flujo se estableció en 0,9 mL/min y la fase móvil de perclorato de litio 20 mM en 90:10 metanol:agua. Se empleó D, L- α -Tocoferol (Sigma, St. Louis, MO) como estándar y los resultados se expresaron como nmol/mg de peso húmedo (ph).

2.6.5. Lipoperoxidación (LPO)

La LPO se estimó a través del contenido TBARS y RL[•]. Los TBARS se determinaron de acuerdo con Guerra y col., (2013). Las muestras se homogeneizaron en una solución salina 1:10 (p/v) (0,9 %) a pH 7,0. Luego, se añadió HCl 0,8 M en ácido tricloroacético (TCA) al 12,5 % a 250 μ L de homogeneizado antes de la adición de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1 %. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 100 °C en un baño de agua, se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 1.500 g durante 10 minutos a 4 °C. Los niveles de TBARS se midieron a 535 nm, usando malondialdehído (MDA) como estándar y se expresaron como equivalentes de pmol MDA por mg de proteína. Las determinaciones se realizaron utilizando un lector de placas Varikosan LUX.

Para la determinación de los RL[•] se homogeneizaron los tejidos en una proporción 1:6 (p/v) en N-tert-butil-a-fenil nitrona (PBN) diluido en dimetilsulfóxido (DMSO). Las muestras fueron incubadas durante 10 minutos a 30 °C antes de ser medidas y las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente (18 °C) en un espectrómetro de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) marca Bruker EMX Plus X utilizando los siguientes parámetros: frecuencia de microondas 9,81 GHz, poder de microondas 20 mW, frecuencia de modulación 50 kHz, amplitud de modulación 1,232 G, constante de tiempo 81,92 ms y ganancia recibida 2×10^4 (Jurkiewicz y Buettner, 1994). La cuantificación se realizó de acuerdo a Kotake y col., (1996) y se expresaron como nmol/mg ph.

2.7. ANÁLISIS DE DATOS

2.7.1. Análisis estadísticos

Los datos se presentan como la media \pm error estándar. Los análisis estadísticos se realizaron con STATISTICA (v. 9.1 Statsoft, versión de prueba), con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Para todas las pruebas paramétricas se realizaron las

transformaciones correspondientes de los datos cuando fue necesario, con el fin de cumplir con las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianza. Todas las pruebas estadísticas se realizaron en cada tejido por separado. Para el análisis de los niveles naturales de As y Cd y de los biomarcadores en los organismos, se compararon las medias mediante ANOVA de dos vías, con sitio y estación anual como factores. Se utilizó el test de Tukey para las muestras del campo e IBR como análisis *post hoc* a fin de evaluar las diferencias entre sitios y estaciones. En los ensayos de letalidad se compararon las medias de todos los tratamientos mediante ANOVA de una vía utilizando la dosis de exposición como factor y en los subletales se empleó ANOVA de dos vías, con la dosis y tiempo de exposición como factores. En los casos donde se detectaron efectos de los factores se realizaron comparaciones entre los expuestos y el control con la prueba de Dunnet.

Para la determinación de la concentración letal media (CL₅₀) a 96 h de As y Cd y los correspondientes intervalos de confianza al 95%, se empleó el método de análisis Probit (US EPA program v.1.5) según el modelo log X.

2.7.2. Evaluación de riesgos para la salud humana

El cociente de riesgo (THQ, por sus siglas en inglés, *Target Hazard Quotient*) es un índice que permite evaluar el riesgo de consumo de un alimento con determinados niveles de un tóxico. Se define como la relación entre la exposición al tóxico y la dosis de referencia que es el nivel más alto en el que no se esperan efectos adversos para la salud. La dosis de referencia es específica para el elemento que se evalúa. El THQ describe el riesgo no cancerígeno para la salud que representa la exposición al elemento tóxico respectivo. Si el THQ es < 1, no se esperan efectos cancerígenos para la salud. Sin embargo, si el THQ es >1 existe la posibilidad de que se experimenten efectos adversos para la salud (Antoine y col., 2017).

El método de estimación del riesgo a través de THQ utilizado fue desarrollado por la U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency, 1989) (ecuación 1):

$$THQ = \frac{FE * DE * C * TID}{DRO * PC * TPE}$$

(Ecuación 1)

donde FE es la frecuencia de exposición (días/año), DE es la duración de la exposición (años), C es la concentración del tóxico en el alimento ($\mu\text{g/g ph}$), TID es la tasa de ingesta diaria (kg/persona/día), DRO es la dosis de referencia oral proporcionada por la base de datos en línea del Sistema Integrado de Información de Riesgos (IRIS) de la US EPA (U.S. Environmental Protection Agency, 1991, 1989), PC es el peso corporal de un adulto (kg) y TPE es el tiempo promedio de exposición a compuestos no cancerígenos ($365 \text{ días/año} \times \text{DE}$). Las estimaciones se realizaron con los siguientes parámetros: FE = 48 d/año, DE = 70 años, TID = 0,0023 g/d, DRO (As) = 3×10^{-4} mg/kg/d, DRO (Cd) = 1×10^{-3} mg/kg/d, PC = 70 kg y TPE = 25550 d (Griboff y col., 2017; Primost y col., 2017). Se asumió que la dosis de ingestión es igual a la dosis de contaminante absorbida y que la cocción no tiene ningún efecto sobre los contaminantes.

Para el cálculo del THQ las concentraciones de As y Cd utilizadas fueron referidas en peso húmedo en función de la humedad calculada en cada muestra. En el caso particular del As, se considera que la fracción tóxica es aquella inorgánica, y que en alimentos de origen marino dicha fracción corresponde a 3,5 % del As total (Martorell y col., 2011). Por lo tanto, para realizar el cálculo del THQ del As solo se utilizó el porcentaje de As inorgánico estimado para cada muestra.

2.7.3. Índice de respuesta integrada de biomarcadores (IBR)

El cálculo de IBR necesita una selección previa de respuestas biológicas para ser considerado. Beliaeff y Burgeot (2002) sugirieron que solo la selección cuidadosa de una combinación apropiada de biomarcadores puede proporcionar información sobre los efectos ambientales adversos globales. Estudios previos sobre el uso de IBR no explican cómo seleccionar biomarcadores para incluirlos en este índice de herramienta matemática. El uso de árboles de regresión potenciados (BRT) por sus siglas en inglés de *Boosted Regression Trees*) permite seleccionar aquellos biomarcadores que se utilizarán en el IBR, con mayor capacidad para predecir la exposición a contaminantes. El modelo de BRT se construyó con los paquetes GBM (Ridgeway, 2013) en R (versión 0.98.953), utilizando el código descrito por Elith y col. (2008). Este método construye una secuencia de modelos de complejidad creciente para describir las relaciones entre la respuesta (concentración de exposición) y las variables predictoras (biomarcadores). El proceso de construcción del modelo en BRT se refiere a un avance por etapas, que refleja el hecho de que en cada paso se agrega un término al modelo para disminuir ligeramente la

desviación. Los términos agregados son en forma de pequeños árboles de regresión que se ajustan al gradiente de la desviación (residuos generalizados) (Bertrand y col., 2016).

El IBR se realizó de acuerdo con el protocolo de Beliaeff y Burgeot (2002) con modificaciones de Devin y col., (2014). Se calculó y estandarizó el valor medio (X_i) y la desviación estándar (DS_i) para cada biomarcador en cada estación anual y sitio, así como la media general (m_i). El valor X_i se estandarizó para obtener Y_i , donde $Y_i = (X_i - m_i)/SD_i$. Posteriormente, se determinó $Z_i = -Y_i$ o $Z_i = Y_i$ en el caso de un efecto biológico correspondiente a la inhibición o activación. Luego, las puntuaciones de biomarcadores (S) se calcularon como $S = Z + |\text{Min}|$, donde $Z \geq 0$ y $|\text{Min}|$ es el valor absoluto de todas las Y calculadas para un biomarcador determinado (incluidas todas las mediciones).

El IBR se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula (ecuación 2):

$$IBR = S_1 * \frac{S_2}{2} + S_2 * \frac{S_3}{2} + \dots S_{n-1} * \frac{S_n}{2} + S_n * \frac{S_1}{2}$$

(Ecuación 2)

Para el cálculo de IBR, se eligieron seis parámetros a través de un modelo de árboles de regresión reforzado (BRT por sus siglas en inglés de Boosted Regression Trees) descrito en Bertrand y col. (2016). Este método construye una secuencia de modelos de complejidad creciente para describir las relaciones entre diferentes escenarios y las variables predictoras (biomarcadores). Se calcularon diversos IBR con el software R Studio a partir de los mismos datos, cambiando el orden de los biomarcadores y utilizando la mediana de todos los valores como el valor de índice final (Devin y col., 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
3. CARACTERIZACIÓN AMBIENTAL

CAPÍTULO 3. Resultados y discusión: caracterización ambiental

3.1. ANÁLISIS DE ARSÉNICO Y CADMIO

3.1.1. Agua y sedimentos

En la Tabla 1 se presentan las concentraciones de As y Cd medidas en invierno (2015) y verano (2016) en el agua de mar y en los sedimentos de San Román y El Riacho, así como los niveles guía de calidad de agua para la protección de la vida marina del Consejo Canadiense de Ministros del Ambiente (Canadian Council of Ministers of the Environment CCME, 2014, 2002, 1997). En las muestras de agua de San Román se hallaron valores de ambos elementos mayores a los niveles guía, mientras que en las de El Riacho este patrón se observó únicamente para Cd. Con respecto a los sedimentos, ninguna muestra superó los niveles guía previamente mencionados. Los valores de As se encontraron en un rango estrecho ($3,79 \pm 0,53 \mu\text{g/g}$), mientras que la concentración de Cd fue siempre no detectable ($< 0,5 \mu\text{g/g}$).

Tabla 1. Niveles de As y Cd en agua y sedimentos en San Román y El Riacho. Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$).

Estación	Sitio	AGUA [†]		SEDIMENTOS	
		As ($\mu\text{g/L}$)	Cd ($\mu\text{g/L}$)	As ($\mu\text{g/g}$)	Cd ($\mu\text{g/g}$)
INVIERNO	San Román	51	1,1	$4,55 \pm 0,39$	$< 0,5$
	El Riacho	<10	0,9	$3,41 \pm 0,19$	$< 0,5$
VERANO	San Román	14	0,5	$3,76 \pm 0,23$	$< 0,5$
	El Riacho	10	0,5	$3,44 \pm 0,13$	$< 0,5$
Valor de referencia*		12,5	0,1	7,2	0,7

* Niveles guía de calidad de agua y sedimentos para la protección de la vida acuática marina (Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME), 2014, 2002, 1997).

[†] Por cuestiones analíticas solo se obtuvieron los resultados de una única muestra de agua.

La concentración de As total en aguas limpias del océano abierto es de $0,5$ a $3 \mu\text{g/L}$, con una media de aproximadamente $1,7 \mu\text{g/L}$ (Neff, 2002a). Los valores registrados en la presente tesis son más altos que aquellos en aguas marinas de sitios con bajo impacto antrópico como los del Golfo de Aqaba ($0,46 - 1,55 \mu\text{g/L}$), del Golfo Árabe en Kuwait ($0,01 - 0,06 \mu\text{g/L}$), de la costa noruega ($0,25 - 2,5 \mu\text{g/L}$), de la costa de Malasia ($0,7 - 1,8 \mu\text{g/L}$), de la costa australiana ($1,1 - 1,6 \mu\text{g/L}$) y de la costa de España ($0,5 - 3,7 \mu\text{g/L}$) (El-Sorogy y col., 2016). Sin embargo, los valores de As en el GSJ son similares a los

registrados en las aguas marinas del Atlántico Norte y el Pacífico Norte (20 µg/L) y de la Isla Tarut en Arabia Saudita (8,55 – 14,88 µg/L) (El-Sorogy y col., 2016).

Las concentraciones medias de Cd en las aguas superficiales del océano abierto se encuentran dentro del rango de 1 a aproximadamente 100 ng/L. En aguas costeras limpias, las concentraciones pueden aumentar a más de 200 ng/L, con máximas superiores a 5000 ng/L en los estuarios que reciben drenaje de las áreas de minería de metales (Neff, 2002b). En este estudio, los valores de Cd hallados (500 - 1100 ng/L) en el agua de mar estuvieron por encima de los reportados por otros autores para sitios con bajo o nulo impacto antrópico como en Antártida de 11 - 78 ng/L (Bargagli y col., 1996), en Galicia, España de 26 - 34 ng/L (Yebra y col., 2002), en Salvador, Brasil de 125 – 625 ng/L (Ferreira y col., 2004) y en aguas superficiales subantárticas de Nueva Zelanda 0,4 - 5,7 (Ellwood, 2004).

En el GSJ, los altos niveles de As y Cd informados en la literatura para el alga *U. pinnatifida* (Gil y col., 2015) evidencian indirectamente la presencia y biodisponibilidad en agua de ambos elementos. Cabe destacar que, para este sustrato, no fue posible realizar comparaciones estadísticas de concentración de los contaminantes entre los sitios dado que los análisis no pudieron realizarse con réplicas. En la **Tabla 2** se muestran los resultados de los parámetros físico-químicos del agua de mar en profundidad en la zona de la recolección de los organismos. Si bien estos sitios poseen características hidrográficas distintas (Hernández-Moresino y col., 2017), las diferencias en los parámetros analizados fueron exclusivamente entre invierno y verano, y por lo tanto no explicarían diferentes concentraciones de tóxicos entre ambos sitios.

En los sedimentos los niveles de As no mostraron diferencias significativas (ANOVA $p < 0,05$) entre sitios y estaciones. Los valores hallados en este estudio fueron bajos considerando que en los sedimentos costeros no contaminados normalmente tienen concentraciones en el rango de 5 – 15 µg/g (Neff, 1997). De la misma manera, los niveles de Cd en sedimento estuvieron por debajo de los 0,5 µg/g ps, que en comparación a aquellos en otros sitios marinos se consideran bajos (Youssef y col., 2015).

Debido a las escasas actividades antropogénicas que se desarrollan en el GSJ, la presencia de As y Cd en los sitios estudiados tendría su origen en fuentes naturales. La contribución de As al agua de mar está probablemente relacionada con el agua subterránea y las cenizas volcánicas (Alvarez y Carol, 2019; Farnfield y col., 2012). Lamela y col.

(2019) analizaron la relación entre el vulcanismo de la Cordillera de los Andes del Sur, la hidrología y los niveles de As en la biota en el norte de la Patagonia y en las islas Shetland del Sur en la Antártida. En dicho trabajo hallaron las mayores concentraciones de As en el agua cercana a los procesos geotérmicos en los volcanes, disminuyendo desde la Cordillera de los Andes hasta la costa atlántica. Los procesos de lixiviación y solubilización, que dependen de las interacciones geosfera-hidrosfera-atmósfera, conducen al As y a otros metales tóxicos a disolverse en el agua y por lo tanto, factores como el pH, el potencial redox, la temperatura y el efecto de adsorción modifican la movilidad del arsénico en los sistemas acuáticos (Smedley y Kinniburgh, 2002). De esta manera, el agua se convierte en el principal vector de diseminación de As y otros metales tóxicos que pueden introducirse en la biosfera e incorporarse a la cadena alimentaria (Bundschuh y col., 2012). En Península Valdés, en el agua subterránea se han registrado altas concentraciones de As, F (flúor) y V (vanadio), cuyo posible origen es el vidrio volcánico que constituye las cenizas de los sedimentos. A pH alcalino, la alta solubilidad del sílice permite que las cenizas volcánicas liberen los iones de As, F y V al agua subterránea que posteriormente descarga en el GSJ (Alvarez y Carol, 2019).

Los valores bajos son explicados por la nula actividad antrópica en el GSJ dado que las principales fuentes de contaminación por As son los productos químicos agrícolas, como herbicidas, fungicidas, rodenticidas e insecticidas. La lixiviación de los desechos expuestos del drenaje de grandes áreas industriales transporta As incrementado de una variedad de fuentes industriales y domésticas.

Por otro lado, la presencia de Cd en agua de mar usualmente es atribuida a fenómenos físicos como las surgencias o la dinámica marina que traslada los sedimentos con distintas cargas de metales a través de las corrientes litorales (Pérez y col., 2005; Segovia-Zavala y col., 1998). Este elemento posee una distribución en el océano que está altamente correlacionada con la de los nutrientes, particularmente el fosfato. En una distribución típica del tipo de nutrientes, como la que exhibe el Cd, los niveles se agotan cerca de la superficie y se enriquecen en aguas profundas. De esta manera, el afloramiento de aguas, desplaza de forma ascendente aguas marinas ricas en nutrientes y elementos como el Cd, que surgen como resultado de la remineralización por bacterias de restos orgánicos que se van acumulando en las capas más profundas de la columna de agua (Sañudo-Wilhelmy y Flegal, 1996).

Tabla 2. Parámetros físico-químicos del agua de mar en los sitios de estudio.

	INVIERNO		VERANO	
	San Román	El Riacho	San Román	El Riacho
Prof. (m)	6	4	14	9
Temp. (°C)	11,06	10,81	16,11	18,32
Sal (ppt)	33,14	33,11	32,11	32,96
Odsat (%)	54,2	54,2	111,1	85,3
O₂ (mg/L)	4,84	4,86	9,60	6,59
pH	8,18	8,2	8,32	8,38
TDS (g/L)	32,98	32,96	32,62	32,65

3.1.2. Organismos

Los niveles de As (9-18 µg/g ps) y Cd (2-90 µg/g ps) en los tejidos analizados, presentaron un patrón similar en ambas estaciones y sitios de estudio (**Fig. 9 a y Tabla 3**), registrándose en todos los casos las mayores concentraciones en la glándula digestiva. En la bibliografía, en zonas de bajo o nulo impacto antrópico, se reportan concentraciones variables de As y Cd para diferentes especies de bivalvos provenientes de sitios con bajo o nulo impacto antrópico. En ese sentido, se han informado niveles de As de aproximadamente 8 µg/g ps en tejidos blandos completos de *Chlamys hastate* y *Pecten maximus* (Meador y col., 2004; Phillips, 1990). En la vieira *Comptopallium radula* se han reportado niveles de As de 49,3 – 99,2, 293 – 420 y 25,0 – 36,2 µg/g ps (Meador y col., 2004) y en *P. maximus* niveles de 16 ± 0,3, 15 ± 0,9 y 10 ± 0,1 µg/g ps (Saavedra y col., 2008) en branquias, glándula digestiva y músculo, respectivamente.

En cuanto al Cd, se han reportado diversos niveles de hasta 130 µg/g ps en glándula digestiva y alrededor de 14 µg/g ps en branquias de la vieira antártica *Adamussium colbecki* (Viarengo y col., 1993). Por otro lado, en la vieira *P. maximus* de la se registraron niveles de Cd de 6 ± 1, 120 ± 8 y 1,3 ± 0,2 µg/g ps (Saavedra y col., 2008) . En tejidos de la vieira *Pecten novaezelandiae* proveniente de Nueva Zelanda los valores de Cd fueron de 3 – 17, 125 – 1024, 2 – 18 µg/g ps (Peake y col., 2010) en branquias, glándula digestiva y músculo, respectivamente.

Solo en branquias, los niveles de As y Cd mostraron una interacción significativa entre los sitios y estaciones con diferencias significativas para ambos elementos en El Riacho en invierno. Los niveles de ambos elementos en todos los tejidos mostraron diferencias estacionales al menos en un sitio de estudio, siendo los valores más altos los registrados en las glándulas digestivas en el verano. Además, la glándula digestiva y el músculo

tuvieron valores significativamente más altos en verano que en invierno, en contraste con los valores más bajos de branquias en verano de El Riacho. En particular, los niveles de Cd mostraron diferencias significativas entre las estaciones en los tres tejidos en El Riacho y solo en las glándulas digestivas en ambos sitios (**Fig. 9** y **Tabla 3**), siendo en su mayoría más altos en verano que en invierno. Sin embargo, los patrones de concentración temporal poco claros de los dos elementos en ambos sitios de estudio sugieren que otros factores podrían estar afectando su bioacumulación.

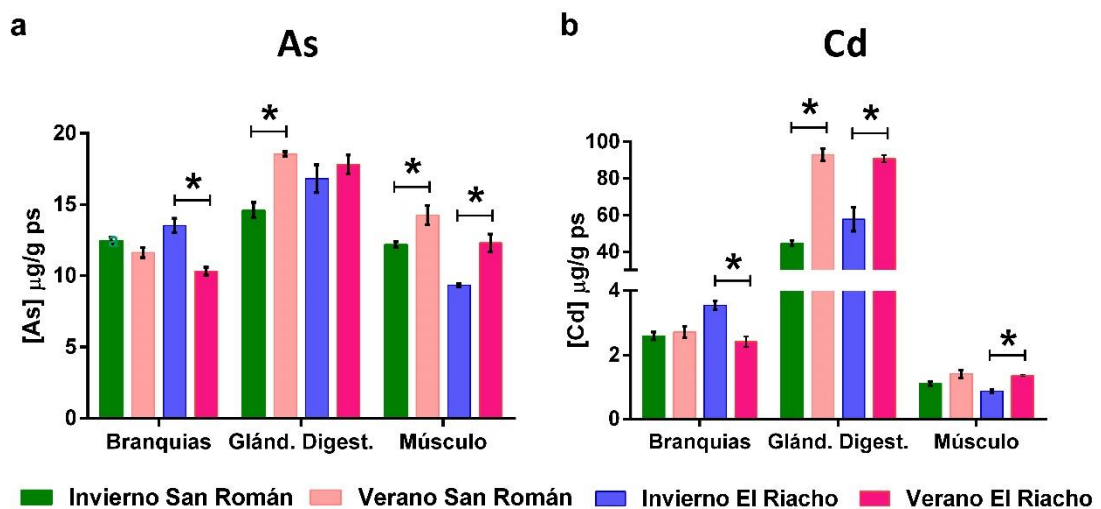


Fig. 9. Concentración total de As (a) y Cd (b) ($\mu\text{g/g ps}$) en branquia, glándula digestiva y músculo de *A. tewelchus* del golfo San José.

Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$). Los asteriscos muestran diferencias significativas entre invierno y verano para cada tejido (ANOVA; $p \leq 0,05$). Las diferencias entre sitios para cada estación no se muestran.

Al comparar los sitios, los niveles de As en San Román fueron significativamente más altos que en El Riacho en verano para las branquias, mientras que los niveles de Cd en invierno fueron significativamente más bajos en las branquias del último sitio. En la glándula digestiva, no hubo diferencias significativas entre los sitios para ambos elementos. En el músculo, en invierno, los niveles de As fueron significativamente más altos en San Román.

Los niveles de As total medidos en branquias, glándula digestiva y músculo mostraron una fuerte variabilidad estacional, siendo los valores más altos registrados en invierno para la branquia y en verano para la glándula digestiva y el músculo (**Fig. 9 a** y **Tabla 3**). Las vieiras se alimentan por filtración y, por lo tanto, acumulan en sus tejidos altas

concentraciones de muchos contaminantes orgánicos e inorgánicos que se encuentran disueltos y/o en partículas presentes en la columna de agua (Benali y col., 2015).

Los niveles Cd en glándula digestiva fueron al menos 10 veces mayores respecto a los otros tejidos para ambos sitios y temporadas, mientras que las branquias y músculo presentaron valores dentro del mismo orden de magnitud (**Fig. 9 b**). En concordancia con ello, otros investigadores encontraron concentraciones de Cd 10 veces mayores o incluso más en el hígado o glándula digestiva que en el músculo de bivalvos (Neff, 2002b). Las branquias son una de las principales vías por las cuales los iones metálicos entran en los organismos acuáticos, siendo los primeros órganos diana de acumulación. En los bivalvos, hay una transferencia de iones desde las branquias a los órganos digestivos y, por esta razón, las concentraciones de estos metales(oides) son generalmente inestables en las branquias, a diferencia de las concentraciones en otros tejidos que permanecen aproximadamente constantes (Zhang y col., 2015). Esta observación indica que el Cd fue probablemente adsorbido por la capa de mucus en las branquias y luego se almacenó en la glándula digestiva, donde los animales marinos secuestran metales en gránulos insolubles o se unen a proteínas tisulares como las metalotioneínas (Engel y Fowler, 1979; Neff, 2002). Estas variaciones podrían atribuirse a los cambios estacionales en el ciclo reproductivo y la disponibilidad de alimentos que conducen a alteraciones en el peso corporal y la composición de los organismos (Giarratano y col., 2011).

Bustamante y Miramand (2005) encontraron en la vieira *Chlamys varia* que el tipo de tejido, el tamaño del organismo y la estación explicaban 97% de la variación entre las concentraciones de Cd de sus tejidos. La mayoría de los compartimentos presentaban variaciones estacionales que no eran sincrónicas entre los diferentes tejidos. Los alimentos ingeridos se digieren y se absorben en la glándula digestiva, donde el Cd, Cu y Zn probablemente se unen a proteínas como las MT. Una vez dentro del organismo, los metales pueden translocarse a otros tejidos, incluidos los riñones (órganos excretores) o tejidos como el músculo aductor, donde quedan atrapados en gránulos de calcio y fosfato (de Mora y col., 2004). De la misma manera, en la presente tesis, se han encontrado los mayores niveles de As y Cd en glándula digestiva y músculo durante el verano, es decir la época con mayor tasa de alimentación respecto al invierno de los bivalvos.

Las concentraciones de metal(oides) pueden variar estacionalmente, pero no siempre es evidente si esto se debe a variaciones y/o fluctuaciones ambientales, fisiológicas o a la disponibilidad de alimentos. La producción de gametas conduce al desove y resulta muy

probablemente en la pérdida de metales del cuerpo (Marsden y Cranford, 2016). Las variaciones estacionales en la acumulación de As y Cd estarían impulsadas por la interacción compleja entre factores abióticos, como la temperatura, la salinidad y el suministro de alimentos, y factores endógenos, como el sexo, la edad, la condición fisiológica, el ciclo reproductivo, entre otros (Marsden and Cranford, 2016; Schmidt y col., 2013).

3.1.3. Límites del CAA y cociente de riesgo (THQ)

Según la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura de Argentina, el consumo de moluscos en 2016 representó 12,5 % del total de los productos pesqueros colocados en el mercado local. A pesar de que las vieiras constituyen un pequeño porcentaje en la dieta argentina, es preocupante que los niveles totales de As en todos los tejidos analizados y aquellos de Cd en la glándula digestiva, excedieron el límite establecido por el Código Alimentario Argentino (CAA, 2012) de 1 y 2 $\mu\text{g/g ph}$, respectivamente. Cabe aclarar que el CAA determina los valores límite en el tejido blando. Si bien el músculo es el único tejido exportado en Argentina el cuerpo blando completo también es consumido. Los resultados de As y Cd en el tejido blando completo fueron de $2,65 \pm 0,15$ y $1,51 \pm 0,02$ $\mu\text{g As/g ph}$ y $1,60 \pm 0,19$ y $1,14 \pm 0,05$ $\mu\text{g Cd/g ph}$ en San Román y El Riacho, respectivamente. Los niveles de As excedieron aquellos establecidos por el CAA mientras que los de Cd se mantuvieron por debajo, pero superando el 50 % de dicho límite. En particular, los niveles de As en músculo (único tejido consumido individualmente), fueron de $2,65 \pm 0,06$ y $2,33 \pm 0,11$ $\mu\text{g As/g ph}$ en San Román y El Riacho, respectivamente, superando el límite del CAA. En el caso de los niveles de Cd en el músculo fueron de $0,26 \pm 0,06$ y $0,25 \pm 0,01$ $\mu\text{g Cd/g ph}$ en San Román y El Riacho, respectivamente, por debajo del límite del CAA.

Los resultados de THQ en los tres tejidos y en el tejido blando completo se muestran en la **Fig. 10**. Tanto para el As como para el Cd la glándula digestiva es la que mayor riesgo implicaría para su consumo (0,0021 y 0,023, respectivamente), sin embargo, es un tejido que no se consume dada su baja palatabilidad. De todos modos, el mayor THQ después de la glándula digestiva fue el tejido blando completo que registró 0,0013 y 0,023, para As y Cd respectivamente. Considerando que estos valores están muy por debajo de la unidad, el consumo de la vieira no implicaría un riesgo para la salud de una población con las características mencionadas. Sin embargo, cabe aclarar que en otras

poblaciones en las cuales el consumo de bivalvos es mayor este índice debería recalcularse dado que éste es proporcional al consumo (Primost y col., 2017).

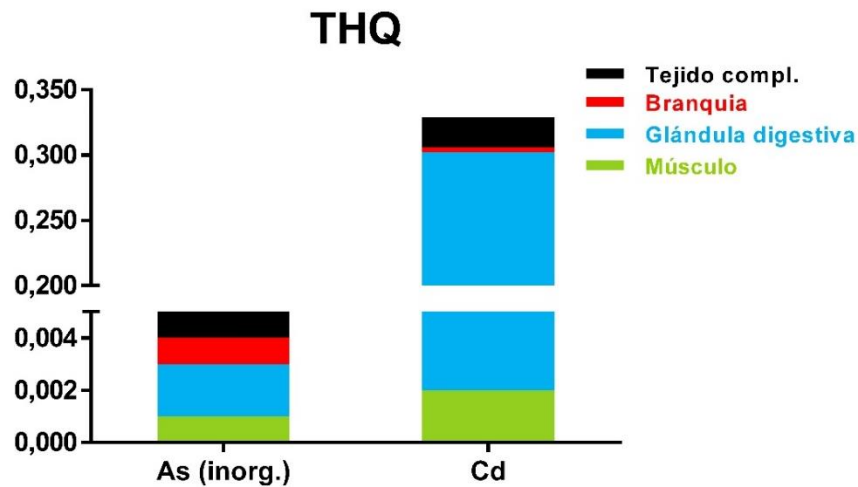


Fig. 10. Cocientes de riesgo (THQ) del consumo de A. tehuelchus en los branquia, glándula digestiva y músculo y en el tejido blando completo para As inorgánico y Cd.

En ese sentido, el índice THQ permite evaluar el riesgo humano real de un tóxico teniendo en cuenta las concentraciones de tóxicos en tejidos blandos, características del consumidor (como la edad y el peso) y la cantidad y frecuencia de ingesta, además del ingreso por otras vías.

3.1.4. Biodisponibilidad del As y Cd

Como se mencionó anteriormente, las formas más abundantes de As inorgánico a pH normal de las aguas marinas son aniónicas para arseniato y principalmente neutras para arsenito y las dos formas orgánicas (MMA y DMA) se encuentran en concentraciones mucho más bajas que las formas inorgánicas. Todo el As disuelto en el agua en invierno es inorgánico; y en primavera y verano, entre 2 y el 18 % del total es MMA y DMA. Los aumentos estacionales en las concentraciones de arsenito y compuestos de metil-As en el agua de mar probablemente se deben a la reducción seguida de la metilación oxidativa del arseniato acumulado por el fitoplancton y las bacterias (Francesconi y Edmonds 1996).

El arseniato es la forma más abundante de As en los sedimentos marinos oxidados y gran parte del As está asociado (coprecipitado o adsorbido) con la fracción de hierro y óxido de manganeso. El arseniato se reduce a arsenito por bacterias en los sedimentos y,

si el azufre es abundante, como es el caso en la mayoría de los sedimentos marinos, la mayor parte del As reacciona con sulfuros para formar minerales como realgar (As₂S₃), inclusiones en sulfuros de cobre y zinc, arsenopirita (FeAsS) u oropimente (As₂S₃). Estos sulfuros tienen una baja solubilidad, movilidad y biodisponibilidad. Por lo tanto, el flujo de As desde los sedimentos marinos hacia la columna de agua adyacente es escaso (Neff, 2002a).

Los animales marinos solo tienen una capacidad limitada para bioacumular As inorgánico a partir del agua de mar o los alimentos (Edmonds y Francesconi 1993). Las plantas marinas pueden bioacumular As inorgánico del agua y transformarlo en formas orgánicas que los animales bioacumulan fácilmente. La mayor parte del As en los tejidos de los organismos está en forma de varias especies organoarsénicas que no son tóxicas ni cancerígenas para los mismos o sus consumidores, incluido el hombre. Gran parte del As orgánico en los tejidos de los animales marinos puede derivarse directa o indirectamente del consumo de fitoplancton o detritos degradados microbianamente (Neff, 2002a).

En relación a lo mencionado anteriormente, las concentraciones de As halladas en los tejidos de *A. tehuelchus* se deberían casi exclusivamente a la bioacumulación diferencial, la transformación y la transferencia trófica de diferentes formas de As desde el fitoplancton consumido, y muy poco probable desde el agua y sedimento del ambiente.

El Cd se encuentra en el agua de mar en una variedad de formas disueltas y sólidas. El Cd metálico es insoluble en agua, pero sus sales de cloruro y sulfato sí lo son. Las especies dominantes de Cd en solución en agua de mar son CdCl⁺¹, CdCl₂ y CdCl₃⁻¹ y cada una representa aproximadamente 30 % del total. Una fracción del Cd en el agua de mar costera puede encontrarse en formas complejadas con materia orgánica coloidal o disuelta, menos biodisponibles que las formas inorgánicas. Sin embargo, con el aumento de la salinidad los complejos orgánicos disminuyen debido a la complejación con cloruros. Como el Cd es un metal muy soluble en ambientes oxidados, permanece en la fase acuosa, estando más disponible para la biota (Neff, 2002b).

Debido a su especiación en el agua de mar, su tendencia a unirse débilmente a las partículas y la formación de sulfuros solubles en condiciones reductoras, el Cd es relativamente móvil en el medio marino. Gran parte de la reserva marina de Cd es intercambiable y potencialmente biodisponible. Sin embargo, el Cd iónico (Cd⁺²), que generalmente representa solo una pequeña fracción del Cd total disuelto en agua de mar,

es la especie más biodisponible. La principal vía de ingreso y acumulación del Cd iónico en los animales marinos a través de las branquias de los animales marinos. A diferencia del As, la mayor parte de la absorción de Cd es pasiva, por simple difusión a través de membranas o por adsorción a la superficie de los epitelios externos (Neff, 2002b). Los invertebrados marinos y los peces también pueden acumular Cd de sus alimentos. Por ejemplo, la eficiencia de asimilación del Cd en mejillones, *Mytilus edulis*, que se alimentan de fitoplancton o seston natural es del 8 al 33 % mientras que la eficiencia de asimilación desde el agua es de 0,18 a 0,35 % (Chalkiadaki y col. 2014). La contribución del Cd disuelto a la bioacumulación total varía del 47 al 82 %, dependiendo de las concentraciones de Cd en el agua y en los alimentos y la capacidad de liberarse de las partículas en suspensión.

3.2. BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

3.2.1. Especies reactivas y enzimas antioxidantes

En las branquias de la vieiras obtenidas en San Román la velocidad de oxidación de la DCFH-DA fue significativamente mayor en verano que en invierno, en la glándula digestiva de ambos sitios la mayor producción se registró en invierno y en el músculo no se observó estacionalidad (**Fig. 11 a y Tabla 3**). La mayor producción se midió en la glándula digestiva y la menor en el músculo. Se sabe que la exposición de organismos acuáticos a metales(oides) puede aumentar la generación de ER, lo que puede provocar un desequilibrio homeostático que activa las defensas antioxidantes para evitar daños en las macromoléculas (Fernández Galindo y col., 2010). Esto explicaría la alta producción de ER en la glándula digestiva, el tejido con los niveles más altos de As y Cd.

El efecto de la estacionalidad presentó diferentes perfiles de respuesta en las distintas actividades enzimáticas analizadas. En general, dichas variaciones fueron similares en los tres tejidos y en aquellos casos con diferencias significativas siempre en invierno se registraron las mayores actividades. Los niveles más altos de SOD se obtuvieron en el invierno en San Román para los tres tejidos, siendo significativamente mayores respecto al verano del mismo sitio (**Fig. 11 b y Tabla 3**). La actividad de CAT no mostró variaciones respecto a los sitios ni estaciones y, por otro lado, la de GST solo las presentó en la glándula digestiva de El Riacho, con valores significativamente mayores en invierno respecto al verano (**Fig. 11 c y d y Tabla 3**).

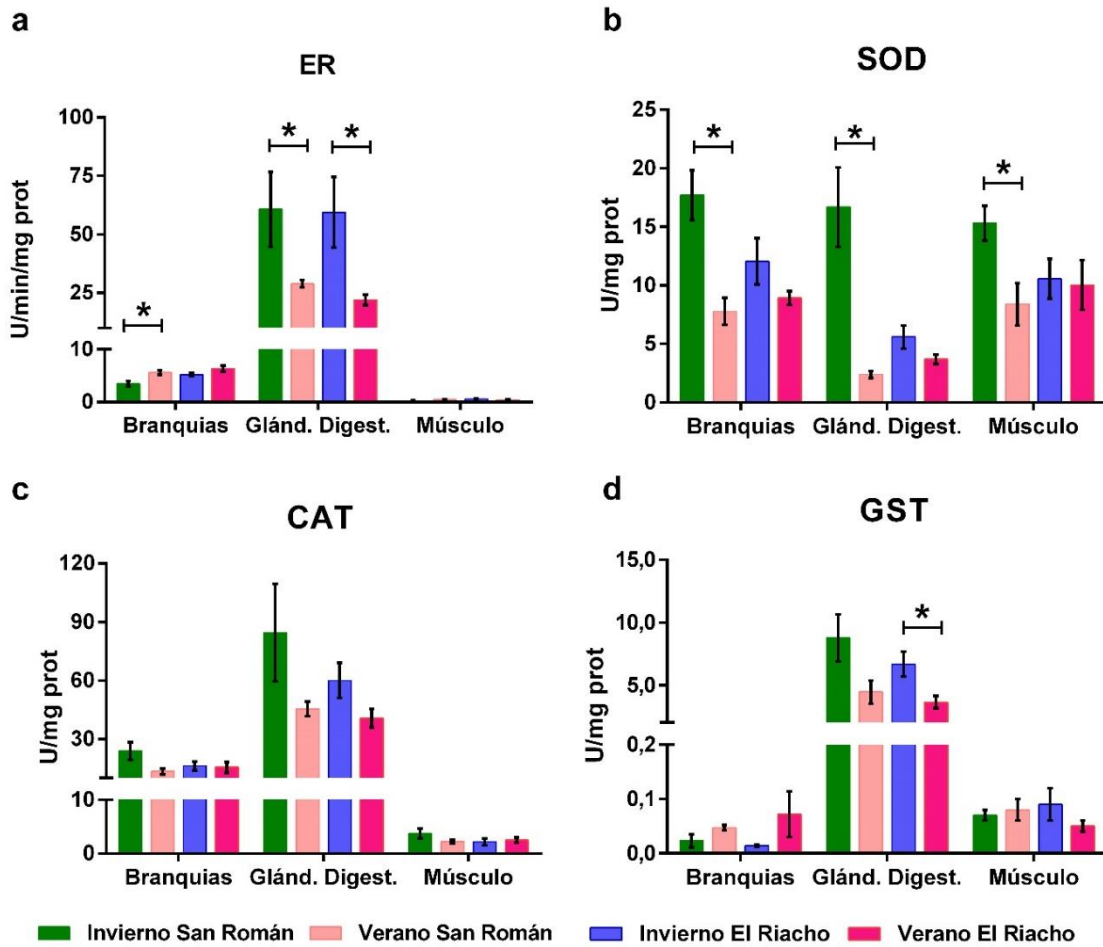


Fig. 11. ER (a), actividades de SOD (b), CAT (c) y GST (d) en branquia, glándula digestiva y músculo de *A. tchuelchus* de San Román y El Riacho en invierno y verano. Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=5$). Los asteriscos indican que los valores son significativamente diferentes entre estaciones del mismo sitio para cada tejido (*t*-Student; $p < 0,05$). No se muestran las diferencias significativas entre los sitios.

En términos generales, las mayores actividades de SOD se registraron en branquias y músculo, mientras que las actividades de CAT y GST fueron mayores en la glándula digestiva (**Fig. 11 b, c y d**). Estos resultados son consistentes con los valores más altos de As y Cd encontrados en ese órgano, probablemente debido al importante papel de la GST como enzima de biotransformación de fase II en la desintoxicación y el metabolismo de los compuestos xenobióticos. Los resultados de este trabajo se corresponden con los reportados por Moreira y Guilhermino (2005) en *Mytilus galloprovincialis* de un sitio no impactado donde la actividad de GST no presentó una marcada estacionalidad, y solo se registró en un sitio niveles significativamente mayores en invierno.

En la primera etapa de biotransformación de un compuesto (fase I), suceden reacciones que convierten grupos funcionales determinados en otros nuevos. En la segunda etapa

(fase II), transcurren las reacciones denominadas de conjugación, que a través de otro grupo de enzimas (entre ellas GST) se combinan los compuestos extraños del organismo, o los metabolitos provenientes de ellos durante la etapa I, con otras moléculas endógenas de bajo peso molecular, como el sulfato, el ácido glucurónico, la glicina, el agua, grupos metilo, etc (Habig y col., 1974). La enzima GST cataliza la S-conjugación entre el grupo tiol (SH) de GSH y los productos de descomposición de los peróxidos lipídicos previniendo el daño oxidativo. En particular, la GST cataliza la unión de GSH con As, el cual posee alta afinidad por los grupos SH de proteínas y enzimas que son cruciales en el metabolismo celular (W. Zhang y col., 2015). La formación de metabolitos metilados es un paso crítico en el metabolismo de las formas inorgánicas y orgánicas de As, y generalmente se supone que la vía de metilación está directamente relacionada con el proceso de desintoxicación (Gaxiola-Robles y col., 2013).

Chen y col. (2018) hallaron en la almeja *Ruditapes philippinarum* una alta afinidad del As en branquias y glándula digestiva, siendo la glándula el tejido de mayor acumulación y donde el As inorgánico era convertido en formas orgánicas. También detectaron un aumento en el nivel de expresión de dos genes de GSTs después de la exposición al As, demostrando el rol significativo de la familia de GSTs en la desintoxicación de As.

En relación al Cd, Zapata y col. (2012) determinaron una estrecha relación entre los niveles acumulados en la viera *Argopecten purpuratus*, especialmente mayores en glándula digestiva respecto a las branquias, y la sobreexpresión de los genes que codifican para la enzima GST. Dichos autores atribuyen el aumento observado en la actividad de GST a la activación natural del sistema de defensa antioxidante por la presencia de una alta concentración de metales y a la inducción de los procesos de desintoxicación.

Tabla 3. ANOVA dos vías: efectos de temporada estacional y sitio en los niveles de As y Cd y biomarcadores en *A. tehuelchus*. Los efectos significativos ($p < 0,05$) están resaltados en negrita.

		Factores/interacción		
		Estación anual	Sitio	Estación x Sitio
Branquia	ER	F(1,20) = 12,36 p = 0,0029	F(1,20) = 7,30 p = 0,016	F(1,16) = 1,09 p = 0,321
	SOD	F(1,20) = 16,99 p < 0,001	F(1,20) = 2,02 p = 0,172	F(1,16) = 4,58 p = 0,048
	CAT	F(1,20) = 3,65 p = 0,075	F(1,20) = 0,50 p = 0,481	F(1,16) = 2,54 p = 0,132
	GST	F(1,20) = 0,44 p = 0,516	F(1,20) = 0,03 p = 0,846	F(1,16) = 2,07 p = 0,169
	MT	F(1,12) = 2,30 p = 0,168	F(1,12) = 0,85 p = 0,384	F(1,8) = 0,02 p = 0,869
	TBARS	F(1,20) = 0,19 p = 0,667	F(1,20) = 12,91 p = 0,002	F(1,16) = 0,0995 p = 0,757
	RL•	F(1,20) = 2,18 p = 0,159	F(1,20) = 0,71 p = 0,411	F(1,16) = 6,19 p = 0,024
	[As]	F(1,12) = 31,29 p < 0,00001	F(1,12) = 0,10 p = 0,760	F(1,8) = 10,63 p = 0,011
	[Cd]	F(1,12) = 11,04 p = 0,01	F(1,12) = 4,62 p = 0,060	F(1,8) = 16,59 p = 0,0036
Glándula digestiva	ER	F(1,20) = 16,16 p = 0,0009	F(1,20) = 0,75 p = 0,398	F(1,16) = 0,46 p = 0,505
	SOD	F(1,20) = 13,10 p = 0,002	F(1,20) = 4,82 p = 0,042	F(1,16) = 7,54 p = 0,014
	CAT	F(1,20) = 4,60 p = 0,048	F(1,20) = 1,16 p = 0,298	F(1,16) = 0,53 p = 0,479
	GST	F(1,20) = 9,70 p = 0,006	F(1,20) = 1,51 p = 0,237	F(1,16) = 0,29 p = 0,594
	MT	F(1,12) = 0,73 p = 0,419	F(1,12) = 0,12 p = 0,733	F(1,8) = 3,05 p = 0,119
	TBARS	F(1,20) = 54,74 p < 0,00001	F(1,20) = 5,05 p = 0,039	F(1,16) = 0,71 p = 0,413
	RL•	F(1,20) = 1,96 p = 0,182	F(1,20) = 0,51 p = 0,485	F(1,16) = 1,50 p = 0,239
	[As]	F(1,12) = 14,14 p = 0,005	F(1,12) = 1,26 p = 0,294	F(1,8) = 5,08 p = 0,054
	[Cd]	F(1,12) = 112,10 p < 0,00001	F(1,12) = 2,01 p = 0,190	F(1,8) = 3,92 p = 0,083
Músculo	ER	F(1,20) = 1,17 p = 0,296	F(1,20) = 0,07 p = 0,802	F(1,16) = 3,46 p = 0,083
	SOD	F(1,20) = 3,07 p = 0,099	F(1,20) = 0,01 p = 0,956	F(1,16) = 2,60 p = 0,126
	CAT	F(1,20) = 5,85 p = 0,028	F(1,20) = 5,38 p = 0,034	F(1,16) = 9,25 p = 0,008
	GST	F(1,20) = 1,11 p = 0,308	F(1,20) = 0,06 p = 0,814	F(1,16) = 1,63 p = 0,220
	MT	F(1,12) = 19,87 p = 0,002	F(1,12) = 3,07 p = 0,118	F(1,8) = 19,06 p = 0,002
	TBARS	F(1,20) = 3,58 p = 0,077	F(1,20) = 0,35 p = 0,565	F(1,16) = 2,31 p = 0,148
	RL•	F(1,20) = 0,80 p = 0,384	F(1,20) = 2,92 p = 0,108	F(1,16) = 4,88 p = 0,043
	[As]	F(1,12) = 27,78 p = 0,001	F(1,12) = 25,31 p = 0,001	F(1,8) = 0,90 p = 0,370
	[Cd]	F(1,12) = 27,82 p = 0,001	F(1,12) = 3,31 p = 0,107	F(1,8) = 1,17 p = 0,310

3.2.2. Metalotioneínas

El contenido de MT en branquias y glándula digestiva no mostró efecto significativo de la interacción estacionalidad-sitio y tampoco de la estacionalidad, en ninguno de los sitios (**Tabla 3** y **Tabla 4**). Sin embargo, en el músculo hubo un efecto significativo de la interacción estacionalidad-sitio, observándose diferencias significativas entre estaciones solo en San Román, con el valor más alto en verano ($11,5 \pm 1,2$ nmol-SH/mg prot.) y sin diferencias en El Riacho (**Tabla 3** y **Tabla 4**). Por otro lado, entre sitios el músculo presentó niveles significativamente mayores en San Román respecto a El Riacho ($11,5 \pm 1,2$ y $5,0 \pm 0,1$ nmol-SH/mg prot. respectivamente) (**Tabla 3** y **Tabla 4**).

Basado en la suposición de que las MT son inducidas por metales, se esperaría que los tejidos con las mayores concentraciones de metal acumulado tengan los niveles de MT más altos. En numerosos trabajos con bivalvos se han hallado mayores concentraciones de MT en la glándula digestiva que en las branquias (Amiard y col., 2006; Bebianno and Serafim, 1998; Raspor y col., 1999), sin embargo, en este trabajo no se encontró una clara tendencia de la distribución tisular. Esto puede deberse a que la síntesis de MT puede variar considerablemente entre los tejidos (Zorita y col., 2007) y puede relacionarse con diversos factores, tanto bióticos como abióticos y no solo a la acumulación de As y Cd en los tejidos (Isani y col., 2000).

A pesar de que se ha propuesto una mayor afinidad de MT para Cd que para As (Garla y col., 2016), las concentraciones de ambos elementos en la glándula digestiva no habrían alcanzado el nivel en el que inducirían una síntesis adicional de MT para desintoxicar el As y Cd encontrados en el presente estudio. Raspor y col. (2005) han reportado resultados similares en el mejillón *M. galloprovincialis*.

Tabla 4. Contenido de MT, α -T, TBARS y RL• en invierno y verano para ambos sitios de estudio en cada tejido. Los resultados se expresan como media \pm ES (n=5).

		INVIERNO			VERANO		
		Branquias	Glándula Digestiva	Músculo	Branquias	Glándula Digestiva	Músculo
MT (nmol-SH/mg prot.)	SR	5,5 \pm 0,2	5,9 \pm 0,3	2,1 \pm 0,8*	4,7 \pm 0,2	4,8 \pm 0,4	11,5 \pm 1,2*
	R	5,8 \pm 0,8	4,5 \pm 0,6	4,9 \pm 1,5	5,2 \pm 0,2	5,3 \pm 0,8	5,0 \pm 0,1
α -T (nmol/mg ph)	SR	44,4 \pm 11,8	69,3 \pm 27,1	4,6 \pm 1,1	68,1 \pm 32,0	77,4 \pm 28,6	s/d
	R	53,1 \pm 12,5	75,4 \pm 16,7	7,3 \pm 1,9	89,0 \pm 27,3	38,2 \pm 6,6	4,41 \pm 0,8
TBARS (pmol/mg ph)	SR	210,0 \pm 23,5	491,5 \pm 44,5*	273,7 \pm 52,9*	212,2 \pm 17,5	257,8 \pm 10,8*	115,5 \pm 15,8*
	R	141,7 \pm 17,7	404,0 \pm 31,2*	176,0 \pm 67,0	154,9 \pm 7,0	218,0 \pm 12,0*	158,8 \pm 32,6
RL• (pmol/g ph)	SR	1,7 \pm 0,2	2,1 \pm 0,4	0,7 \pm 0,2	1,5 \pm 0,2	3,8 \pm 1,0	0,5 \pm 0,2
	R	1,1 \pm 0,1*	2,3 \pm 0,4	0,1 \pm 0,0*	1,8 \pm 0,2*	2,4 \pm 0,9	0,6 \pm 0,1*

Los asteriscos indican diferencias significativas entre temporadas dentro de cada sitio para cada tejido (*t*-Student; $p < 0,05$). No se muestran diferencias significativas entre sitios. s/d sin datos. SR = San Román. R = El Riacho.

3.2.3. α -Tocoferol

El α -T actúa como defensa antioxidante no enzimática contra la peroxidación lipídica. El contenido de α -T fue casi uniforme en las dos estaciones y fue significativamente mayor en glándula digestiva y branquias respecto al músculo (Tabla 3 y Tabla 4). Dado que el α -T es biosintetizado estrictamente por organismos fotosintéticos, los organismos no fotosintéticos como los bivalvos deben obtenerlos de fuentes alimentarias. Los valores más altos en branquias y glándula digestiva se deben probablemente a que están estrechamente relacionados con la ingesta de alimentos, las branquias como primer tejido en contacto con los alimentos y la glándula digestiva como tejido de almacenamiento y procesamiento del fitoplancton rico en antioxidantes liposolubles (Fujisawa y col., 2010).

3.2.4. Lipoperoxidación (LPO)

La LPO fue estimada a través de TBARS y RL• y los resultados se presentan en la (Tabla 3 y Tabla 4). Cada tejido presentó diferentes efectos significativos de los factores analizados. En la branquia, los niveles de TBARS solo mostraron un efecto significativo del sitio, siendo mayores los valores en San Román respecto a El Riacho tanto para invierno como para verano. Por otro lado, los RL• mostraron una interacción entre estación-sitio, con valores más altos en San Román para el invierno, pero en El Riacho

para verano. En la glándula digestiva, los TBARS presentaron un efecto de la estacionalidad en ambos sitios (mayores niveles en invierno respecto al verano) y los RL^\bullet mostraron un efecto de sitio (en verano San Román mayor que El Riacho). En el músculo los mayores niveles de TBARS se hallaron en las muestras de invierno de San Román, mientras que los niveles de RL^\bullet presentaron una interacción estación-sitio con los niveles más bajos en El Riacho en invierno y valores similares en el resto de los casos analizados.

En los tres tejidos, los niveles de RL^\bullet tuvieron el mismo patrón en los sitios y en las estaciones, siendo los valores más altos medidos en la glándula digestiva, seguidos por las branquias y luego el músculo. Dado que la glándula digestiva es el principal órgano involucrado en la función metabólica, cualquier estrés puede afectar directamente la vía metabólica, lo que resulta en una mayor producción y acumulación de radicales libres. Por otro lado, las branquias se encuentran en continua exposición al medio y al poseer una gran superficie del epitelio aumenta el posible estrés generado por el contacto con el entorno y la presencia de posibles estresores. Las consecuencias de estos radicales libres generados dañan los fosfolípidos de la membrana y cambian la composición de las moléculas de ácidos grasos, generando un aumento de los RL^\bullet (Shenai-Tirodkar y col., 2017). En la **Fig. 12** en contacto con el entorno se muestra el espectro de EPR para RL^\bullet de la glándula digestiva de San Román en invierno.

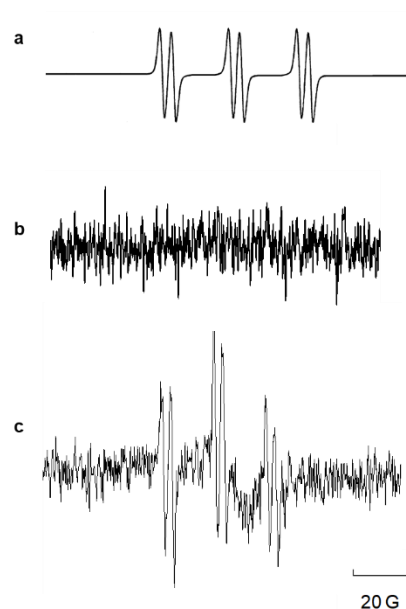


Fig. 12. Detección de radicales lipídicos (RL^\bullet) por EPR. Simulación computada mostrando desdoblamiento hiperfino característico del aducto PBN/ RL^\bullet $aN=15.8$ G y $aH=2.6$ G (a), espectro de EPR de N-t-butil- α -fenil nitrona (PBN) (b) y espectro de EPR de glándula digestiva de San Román en invierno (c).

3.2.5. Efectos de la estacionalidad en biomarcadores de estrés

En términos generales, en esta tesis se han observado diferentes tendencias de estacionalidad en los diferentes biomarcadores analizados en los tres tejidos estudiados. En resumen, se puede decir que, en aquellos biomarcadores donde hubo efecto de la estacionalidad (ER, SOD, GST y TBARS), los mayores niveles se registraron durante el invierno en alguno de los tejidos analizados. Las vieiras son animales ectotérmicos que no regulan su temperatura corporal y, por lo tanto, cualquier variación en la temperatura del agua de mar afecta críticamente su fisiología y procesos metabólicos, incluidos los relacionados con la producción de radicales libres (Lushchak, 2011). Abele y Puntarulo (2004) han reportado un aumento del riesgo de formación de ERO como consecuencia del aumento de los niveles de oxígeno disuelto en el agua de mar debido a la disminución en la temperatura ambiental. Este fenómeno ha sido informado en peces e invertebrados marinos, con altos niveles de estrés oxidativo debido a una disminución en la temperatura del agua (Benedetti y col., 2017; Lushchak, 2011; Pires y col., 2015). Además, Di Salvatore y col. (2013) observó una alta correlación entre las bajas temperaturas del agua en invierno y una alta actividad SOD en branquias y en los niveles de oxidación de proteínas en la glándula digestiva de *Aulacomya atra*.

Por otro lado, el efecto de la estacionalidad fue igual en los tres tejidos analizados. Las diferencias en las respuestas de los tejidos informadas en este estudio pueden ser parcialmente atribuibles a los sistemas antioxidantes específicos de cada tejido. Numerosos autores han reportado diferencias entre tejidos en las defensas antioxidantes y, por lo tanto, en la susceptibilidad al estrés oxidativo (Farcy y col., 2013; Maulvault y col., 2018; Regoli y col., 2011; Sarkar y col., 2008).

Las variaciones estacionales surgen de una interacción compleja entre factores exógenos como la temperatura del agua y el suministro de alimento y factores endógenos como el desove (Power y Sheehan, 1996). Por lo tanto, es difícil sacar conclusiones concluyentes de tales variaciones. Sin embargo, a partir de los datos discutidos en este trabajo, está claro que se producen cambios bioquímicos significativos en las branquias, glándula digestiva y músculo de *A. tehuelchus* durante el invierno, reflejando mecanismos de defensa específicos de cada tejido contra el estrés oxidativo.

Power y Sheehan (1996) sugieren que se esperaría que un biomarcador ideal variara solo en respuesta a la exposición a contaminantes, sin mostrar variación estacional en respuesta a factores como parámetros fisicoquímicos del agua, suministro de alimentos o

estado reproductivo. Sin embargo, la mayoría de los biomarcadores muestran, en mayor o menor medida, una tendencia estacional significativa y, como ya lo señalaron otros autores, el presente trabajo respalda la importancia, en el contexto de un programa de biomonitoreo, de seguir las actividades enzimáticas durante un período de tiempo más largo para tener en cuenta su potencial variabilidad estacional.

3.2.6. Índices

TBARS/ α -T y RL \bullet / α -T

Las relaciones TBARS/ α -T y RL \bullet / α -T pueden entenderse como indicadores del equilibrio entre el daño asociado a los radicales libres y la protección antioxidante (Malanga y col., 2007). En general, ambos índices no mostraron diferencias estacionales significativas, excepto para RL \bullet / α -T en el músculo de El Riacho, con el nivel más alto en verano (**Tabla 5**). En ese sentido, los niveles de As y Cd en los músculos de El Riacho también fueron más altos en verano que en invierno. Sin embargo, el músculo presentó signos débiles de daño y contenido de ER con respecto a los otros tejidos. Esto podría

explicarse por los valores más bajos de α -T en el músculo debido a la distribución tisular de los pigmentos antioxidantes estrechamente asociada a los alimentos y con otros órganos como la glándula digestiva (Fujisawa y col., 2010).

Las branquias presentaron cocientes más bajos, sugiriendo una alta capacidad de protección antioxidante dado el daño y la producción de especies reactivas encontrados en este tejido. Por el contrario, la glándula digestiva presentó altas relaciones RL \bullet / α -T, indicando una posible capacidad baja o insuficiente para evitar el daño celular. Además, la glándula digestiva fue el tejido con los valores más altos de As y Cd, actividades de CAT y GST, y contenidos de especies reactivas, TBARS y RL \bullet .

Tabla 5. TBARS/ α -T y RL/ α -T en tejidos de *A. tehuelchus*. Los resultados se expresan como media \pm ES (n=5).

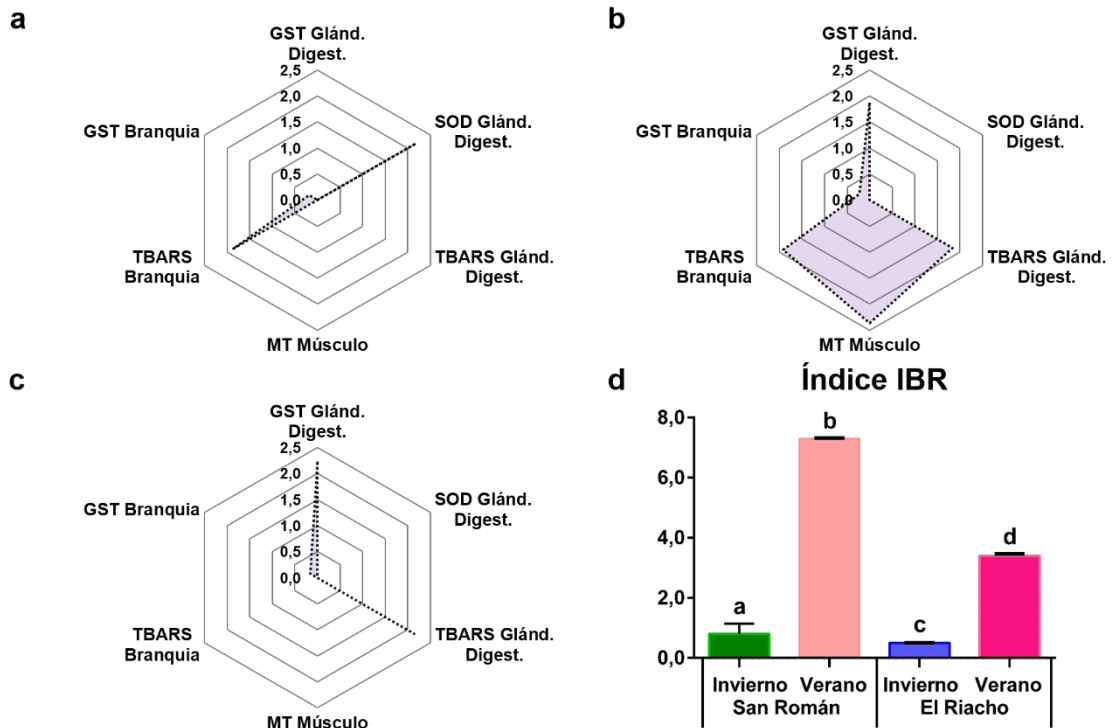
		INVIERNO			VERANO		
		Branquias	Glándula digestiva	Músculo	Branquias	Glándula digestiva	Músculo
TBARS/ α -T (10^{-3})	San Román	5,8 \pm 1,0	11,2 \pm 6,7	56,5 \pm 8,4	7,8 \pm 2,6	4,1 \pm 1,4	s/d
	El Riacho	4,1 \pm 1,5	6,3 \pm 2,0	42,5 \pm 27,5	2,5 \pm 0,6	6,5 \pm 1,2	43,7 \pm 12,8
RL/ α -T (10^{-8})	San Román	5,6 \pm 1,9	14,3 \pm 10,8	16,9 \pm 3,7	5,3 \pm 1,7	8,6 \pm 1,9	s/d
	El Riacho	3,3 \pm 1,4	9,8 \pm 4,3	1,5 \pm 0,5*	2,7 \pm 0,5	20,5 \pm 8,2*	21,69 \pm 13,9

Los asteriscos indican diferencias significativas entre estaciones dentro de cada sitio de estudio para cada tejido (t-Student; $p < 0,05$). No se muestran diferencias significativas entre sitios. s/d sin datos.

Respuesta Integrada de Biomarcadores (IBR)

Se integraron los biomarcadores de efecto un índice IBR destinado a proporcionar una indicación directa del estado de salud en las vieiras y, por lo tanto, del ecosistema que habitan (Beliaeff y Burgeot, 2002). A través del modelo de árboles de regresión reforzado (BRT) se seleccionaron los siguientes biomarcadores para el cálculo del IBR: GST y TBARS para branquia, éstos mismo juntos con SOD para glándula digestiva y MT para el músculo. Los seis biomarcadores seleccionados se representaron en los seis ejes de un gráfico de estrellas (**Fig. 13 a, b y c**). Los valores estandarizados de respuestas de biomarcadores permitieron identificar cuáles de ellos tenían el peso más importante en los valores de IBR finales. Se registraron diferencias significativas entre los sitios y las temporadas, siendo el valor más alto de IBR encontrado en San Román en verano ($7,3 \pm 0,2$) y el más bajo en El Riacho en invierno ($0,5 \pm 0,1$) (**Fig. 13 d**).

El IBR es capaz de identificar las estaciones críticas del año denotando que los contaminantes y/o los factores ambientales influyen en las respuestas de los biomarcadores (Serafim y col., 2012). Los mismos autores sostienen que el IBR puede ser útil para clasificar el estado de salud de los organismos en las áreas costeras. En ese sentido, los valores de IBR (**Fig. 13 b**) indican que las vieiras de San Román y El Riacho se ven más afectadas en verano que en invierno. Esto está en línea con el período de desove, lo que implica estrés adicional (Soria y col., 2016), así como con los valores más altos de As y Cd que se encuentran en la glándula digestiva y en el músculo. El uso de métodos que combinan varias respuestas biológicas en un solo valor, permite la clarificación de los resultados y facilita la disposición a gran escala de biomarcadores en el monitoreo ambiental (Ji y col., 2019).



3.2.7. Correlación entre arsénico y cadmio y biomarcadores de estrés oxidativo

Los biomarcadores de estrés oxidativo y los niveles totales de As y Cd acumulados por *A. tehuelchus* presentaron pocas correlaciones significativas (**Tabla 6**). En las branquias, los niveles de As se correlacionaron negativamente con RL^{\bullet} en invierno ($R^2 = -0,93$) y con α -T en verano ($R^2 = -0,84$). El α -T se consumiría para evitar el posible daño causado por la presencia de As. En la glándula digestiva, los niveles de As se correlacionaron negativamente con la actividad de GST ($R^2 = -0,83$) y MT ($R^2 = -0,84$) en invierno. En verano, los niveles de Cd se correlacionaron positivamente con TBARS ($R^2 = 0,81$). Los mecanismos por los cuales el As puede afectar la inducción de MT son inciertos, pero la capacidad de As para unirse a proteínas ricas en tiol y cisteína podría perturbar la biosíntesis de MT (Bouskill y col., 2006). El músculo exhibió correlación significativa positiva entre la acumulación de As y GST ($R = 0.87$) en invierno y negativa

entre la acumulación de Cd y MT ($R = -0.82$). Incluso cuando las diferencias en las características físicas en ambos sitios son bien conocidas (Amoroso y col., 2011), la respuesta de biomarcadores de vieiras de San Román y El Riacho fue muy similar. Esto podría deberse a la historia de vida de los animales en cada sitio, lo que proporciona tolerancia y adaptación a esas condiciones.

Tabla 6. Coeficiente de correlación entre los niveles de As y Cd y los biomarcadores ambiental. Los números en negrita indican correlaciones significativas a $p < 0,05$.

		INVIERNO			VERANO		
		Branquia	Glándula digestiva	Músculo	Branquia	Glándula digestiva	Músculo
As	ER	0,203	0,236	-0,350	-0,742	0,195	0,340
	SOD	-0,591	-0,694	-0,280	0,405	-0,106	-0,144
	CAT	0,228	-0,776	0,734	-0,075	0,643	-0,745
	GST	0,556	-0,836	0,871	-0,056	0,418	0,487
	MT	0,704	-0,841	-0,534	-0,222	-0,261	0,559
	α-T	0,293	-0,055	-0,550	-0,842	-0,046	0,466
	TBARS	0,655	0,157	-0,055	0,451	0,302	-0,250
	RL[•]	-0,737	0,551	0,486	-0,334	0,264	-0,172
Cd	ER	0,571	-0,055	0,286	-0,440	0,346	-0,758
	SOD	-0,612	-0,697	0,111	0,492	0,104	0,058
	CAT	-0,319	-0,626	0,622	-0,051	0,474	0,771
	GST	0,208	-0,654	0,807	0,019	0,486	0,478
	MT	0,124	-0,439	-0,825	0,154	0,177	0,377
	α-T	-0,413	0,647	-0,311	-0,767	-0,412	-0,230
	TBARS	0,232	0,293	-0,195	0,178	0,812	-0,481
	RL[•]	-0,931	0,491	0,178	-0,477	0,227	-0,493

Los resultados demostraron que cada tejido de la vieira de tehuelche responde de manera diferente a la exposición natural al As y Cd y que los patrones de biomarcadores dependen de la estacionalidad. En la vieira de tehuelche, la glándula digestiva es el tejido principal que acumula As y Cd, así como aquél con la inducción más alta de parámetros de estrés oxidativo como ROS, actividades enzimáticas de CAT y GST, y contenido de TBARS y α -T. Este estudio representa la primera información integral y esencial en la zona para una interpretación adecuada de los datos ecotoxicológicos futuros y los programas de monitoreo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
4. EFECTOS LETALES Y SUBLETALES DE ARSÉNICO
EN *AEQUIPECTEN TEHUELCHUS*

Resultados y discusión: efectos de concentraciones letales y subletales de arsénico en *A. tehuelchus*

4.1. ENSAYOS DE LETALIDAD

4.1.1. Determinación de la concentración letal media (CL₅₀) de As

Todos los parámetros fisicoquímicos fueron constantes a lo largo de los experimentos y no se registró mortalidad en los controles. Ningún animal murió en concentraciones por debajo de 5 mg As/L, registrándose una mortalidad de 17 % en 6,3 mg As/L a las 96 h de exposición. Para dosis superiores a 7,9 mg As/L, la proporción de vieiras muertas aumentó después de 72 h de exposición y alcanzó el 78 % a las 96 h. Solo para la concentración más alta (10 mg As/L), se registró el 100 % de la mortalidad (Fig. 14).

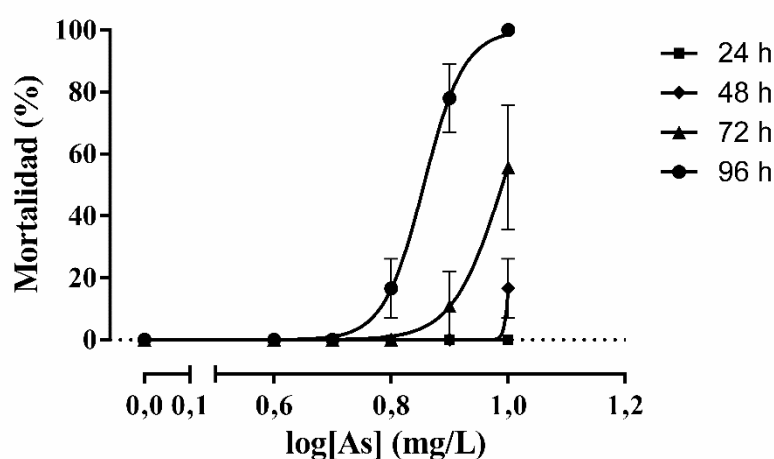


Fig. 14. Porcentaje de mortalidad en *A. tehuelchus* expuestas durante 24, 48, 72 y 96 h a 0; 4; 5; 6,3; 7,9 y 10 mg As/L (media \pm desvío estándar). Cada tratamiento se realizó por triplicado ($n = 6$).

La CL₅₀ no se pudo determinar en los organismos expuestos durante 24 y 48 h, ya que los valores registrados de mortalidad fueron inferiores al 50 % en todas las concentraciones ensayadas. Se pudieron calcular las CL₅₀ a las 72 y 96 h de exposición. La CL₅₀ calculada para 72 h fue 10,5 mg As/L con intervalos de confianza al 95 % de 9,50 y 15,2 mg As/L. A las 96 h, la CL₅₀ fue de 7,1 mg de As/L con intervalos de confianza al 95 % de 6,7 y 7,6 mg de As/L. Los resultados obtenidos en este estudio indican que el As presenta una toxicidad aguda baja para *A. tehuelchus* en comparación con otras especies de vieiras. En ese sentido, Nelson y col. (1976) informaron una CL₅₀

en 96 h de 3,4 mg de As/L para *Argopecten irradians*, aunque dicho experimento se realizó a 20 °C en contraste con este estudio a 13 °C. El metabolismo de los animales está estrechamente relacionado con la temperatura y esa podría ser la razón de la notable diferencia entre las especies. Factores como el tamaño, la temperatura del ensayo y las diferencias inherentes en las vías de defensa podrían explicar estas variaciones en los valores de CL₅₀ (Bryant y col., 1985). Además, es probable que la exposición natural previa de *A. tehuelchus* haya proporcionado una mayor tolerancia al As como ha sido previamente reportado por Azizi y col. (2018). A pesar de ello, este tóxico podría afectar a nivel celular, amenazando la salud de los organismos y por consiguiente a la población de pectínidos en el área.

4.1.2. Acumulación de As en *A. tehuelchus* expuestas 96 h

En todos los niveles de exposición, los tres tejidos mostraron similar patrón de acumulación, según el siguiente orden decreciente: branquia > glándula digestiva > músculo (**Fig. 15**). En términos generales, la branquia presentó valores de alrededor de 13 veces respecto al control en la concentración más alta ensayada, la glándula digestiva 9 veces y el músculo 7.

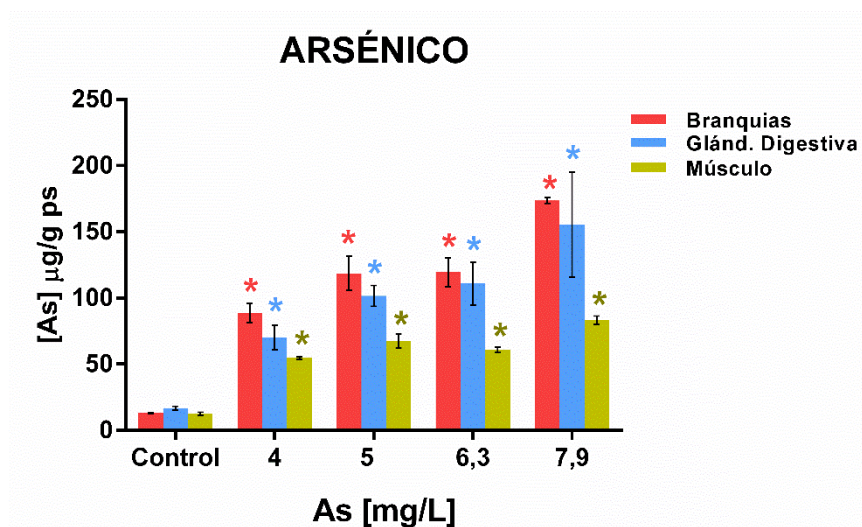


Fig. 15. Concentración de As en branquia, glándula digestiva y músculo de la vieira *A. tehuelchus* luego de 96 h de exposición.

Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tejido (ANOVA – Test de Dunnet; $p < 0,05$).

Se realizaron las comparaciones estadísticas para cada tejido por separado de la concentración acumulada en cada nivel de exposición en función del control (ANOVA con contraste de Dunnet) y comparando todas las concentraciones ensayadas (ANOVA con factor concentración y contraste de Tukey) (**Fig. 15**).

La exposición aguda de 96 h a las diferentes concentraciones de As resultó en un aumento lineal y significativo de la acumulación del mismo en los tres tejidos respecto al control (**Tabla 7**). Dicho comportamiento sugiere que no existe una saturación de los niveles de As en el organismo antes de generar la muerte. Los mecanismos de secuestro del metaloide podrían estar operando, de manera que este permanece en el organismo, pero en ciertas concentraciones no conduce a la muerte en el tiempo de exposición ensayado. Analizando las pendientes de las rectas que mejor explican los datos de acumulación en cada órgano (**Tabla 7**), se observa que la branquia presenta los mayores valores, seguida de la glándula digestiva y el músculo. Estos resultados son consistentes con aquellos reportados por Saavedra y col. (2008) en la vieira *Pecten maximus*, donde se reporta una exposición diferencial de los tejidos. Las branquias están constantemente expuestas al As que se encuentra en el medio, mientras que en los otros órganos la exposición es intermitente e indirecta vía hemolinfa (Moncaleano-Niño y col., 2018). Por lo tanto, las medidas de acumulación de As en las branquias podrían ser una medida rápida para determinar niveles de As ambientales, mientras que la glándula digestiva y en menor medida el músculo, podrían ser indicativos de un historial de exposición.

Tabla 7. Relación entre niveles de exposición de As y acumulación de As en branquia, glándula digestiva y músculo de *A. tehuelchus* luego de exposiciones agudas de 96 h (4; 5; 6,3 y 7,9 mg As/L).

Tratamiento As	Tejido	Coefficiente de determinación (R ²)	Ecuación con mejor ajuste	p
Letal (96 h)	Branquia	0,958	19,042 x + 13,186	< 0,000001
	Glándula Digestiva	0,973	17,074 x + 11,743	< 0,000001
	Músculo	0,932	8,569 x + 16,022	< 0,000001

4.1.3. Indicadores de estrés oxidativo

La capacidad de generación de ER, evaluada a través de la velocidad de oxidación de la DCFH-DA, no registró diferencias significativas en ninguno de los tres tejidos respecto al control (**Fig. 16 a**). Este resultado indica que, si bien existió un aumento en los niveles de As, los mecanismos de defensa antioxidantes estarían evitando la generación de ER. Las actividades enzimáticas de CAT y GST se muestran en la **Fig. 16 b y c**, respectivamente. En la branquia, la mayor actividad de ambas enzimas se registró en la concentración más baja, seguido de los tratamientos con 5 y 6,3 mg As/L. En la glándula digestiva aumentaron en todos los tratamientos respecto al control, mientras que en el músculo no se encontraron diferencias significativas respecto al control.

Con respecto a las MT, se detectó en las dos concentraciones más altas ensayadas un aumento significativo en la branquia y glándula digestiva (**Fig. 16 d**). En el músculo se observó la tendencia opuesta, siendo máxima la concentración en el control y disminuyendo significativamente en todos los tratamientos con As. Esta tendencia podría estar asociada a la menor acumulación de As en este tejido respecto a la branquia y glándula digestiva, derivando en una menor síntesis en el músculo o a una redistribución desde el mismo hacia otros tejidos con mayor efecto del tóxico. Sin embargo, los análisis de MT en músculo de vieiras no son comunes en la bibliografía y para explicar los efectos particulares del As en la síntesis de MT en tejidos específicos como el músculo se deberían realizar nuevos ensayos.

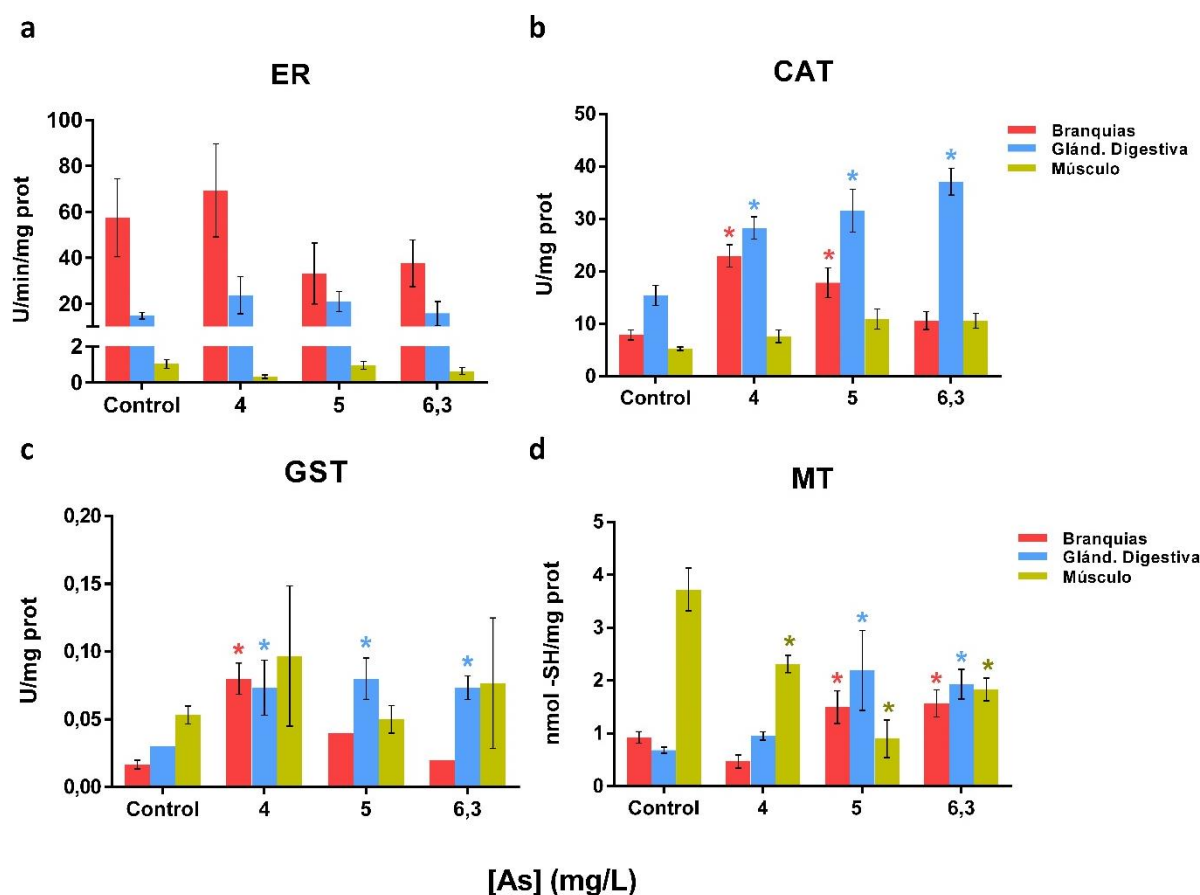


Fig. 16. ER (a), actividad de CAT (b) y GST (c) y contenido de MT (d) en branquia, glándula digestiva y músculo en *A. tehuelchus*, expuestos durante 96 h a diferentes concentraciones de As.

Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tejido (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$).

El contenido de TBARS y de α -T en los tres tejidos analizados luego de 96 horas de exposición a As se muestra en la figura **Fig. 17 a y b**, respectivamente. El contenido de TBARS no mostró diferencias significativas en ninguno de los tejidos respecto al control. Esto se corresponde con los resultados de las ER. Sin embargo, el contenido de α -T en las branquias y músculo de los organismos expuestos a las concentraciones más altas de As disminuyó significativamente respecto al control, no habiendo cambios significativos en la glándula digestiva. El α -T, es un antioxidante no enzimático que en presencia de xenobióticos o algún factor de estrés es consumido con el objetivo de mitigar los posibles daños en la célula.

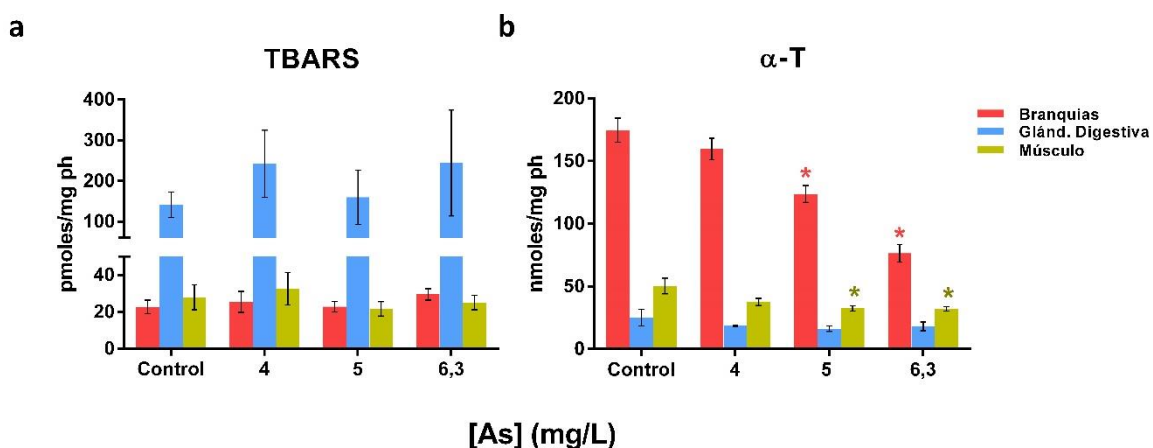


Fig. 17. Niveles de TBARS y α -T en branquia, glándula digestiva y músculo en *A. tehuelchus*, expuestos durante 96 h a diferentes concentraciones de As. Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tejido (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$).

El equilibrio entre el daño de los radicales libres y la protección antioxidante en la fase lipídica puede describirse a través de la relación TBARS/ α -T (**Fig. 18**). Este índice asume que niveles más altos indican mayor daño a los tejidos (Lattuca y col., 2009). No se observaron diferencias significativas de dicho índice ni en la glándula digestiva ni en el músculo, mientras que en la branquia se halló un aumento en la concentración más alta respecto al control, probablemente debido a que los posibles daños no alcanzaron a ser mitigados por el α -T.

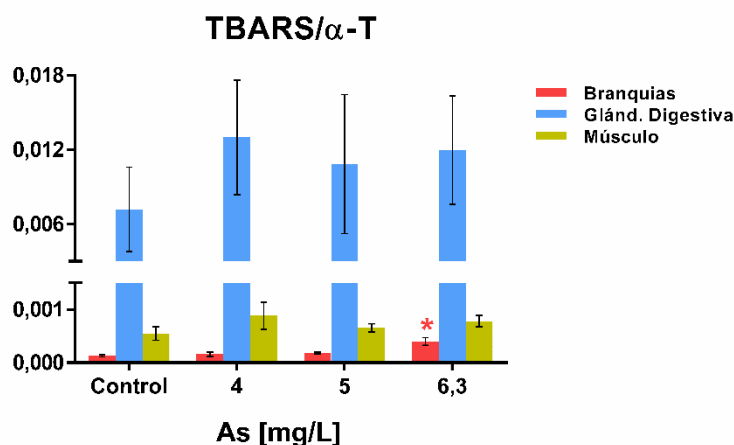


Fig. 18. Índice de TBARS/ α -T en branquia, glándula digestiva y músculo en *A. tehuelchus*, expuestos durante 96 h a diferentes concentraciones de As. Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tejido (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$).

4.1.4. IBR en experimentos de CL₅₀ As

A través del modelo de árboles de regresión reforzado (BRT) se seleccionaron para el cálculo del IBR: MT y α -T en el músculo y en la glándula, y CAT y α -T en la branquia. Los valores obtenidos de IBR se presentan en la **Tabla 8**, y en la **Fig. 19 a** están representados como gráficos de estrella, donde el área en gris integra los valores para cada concentración ensayada. Con el fin de comparar los valores de IBR y el As acumulado en cada tejido, se muestran gráficos de estrella en la **Fig. 19 b, c y d**. Se observaron diferencias significativas de los valores de IBR entre todas las concentraciones de exposición respecto al control. Asimismo, también hubo diferencias significativas entre los tratamientos demostrando un fuerte efecto en la respuesta de los biomarcadores ante un aumento de As en el agua, siendo el mayor valor registrado en la concentración de 5 mg As/L. Si bien se esperarían mayores valores de IBR en la exposición de 6,3 mg As/L, los resultados demuestran que este índice es apropiado como herramienta de integración de biomarcadores en organismos expuestos a algún estresor.

Tabla 8. IBR a diferentes concentraciones de exposición de As en *A. tehuelchus*. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA – Test de Tukey, $p < 0,05$). DE: desvío estándar.

	Índice IBR			
	Media	DE	Min	Max
Control	0,00 ^a	0,00	0,00	0,00
4 mg As/L	3,60 ^a	0,43	2,80	4,39
5 mg As/L	9,22 ^b	0,20	8,92	9,57
6,3 mg As/L	6,88 ^c	0,20	6,49	7,24

Por otro lado, se obtuvieron correlaciones significativas de los valores de IBR con la concentración de exposición ($R^2 = 0,63$; $p < 0,0001$) y con la concentración acumulada en branquias ($R^2 = 0,86$; $p < 0,0001$), glándula digestiva ($R^2 = 0,83$; $p < 0,0001$) y músculo ($R^2 = 0,84$; $p < 0,0001$). En la **Fig. 19** se observa un mayor impacto de las dos concentraciones más altas de As.

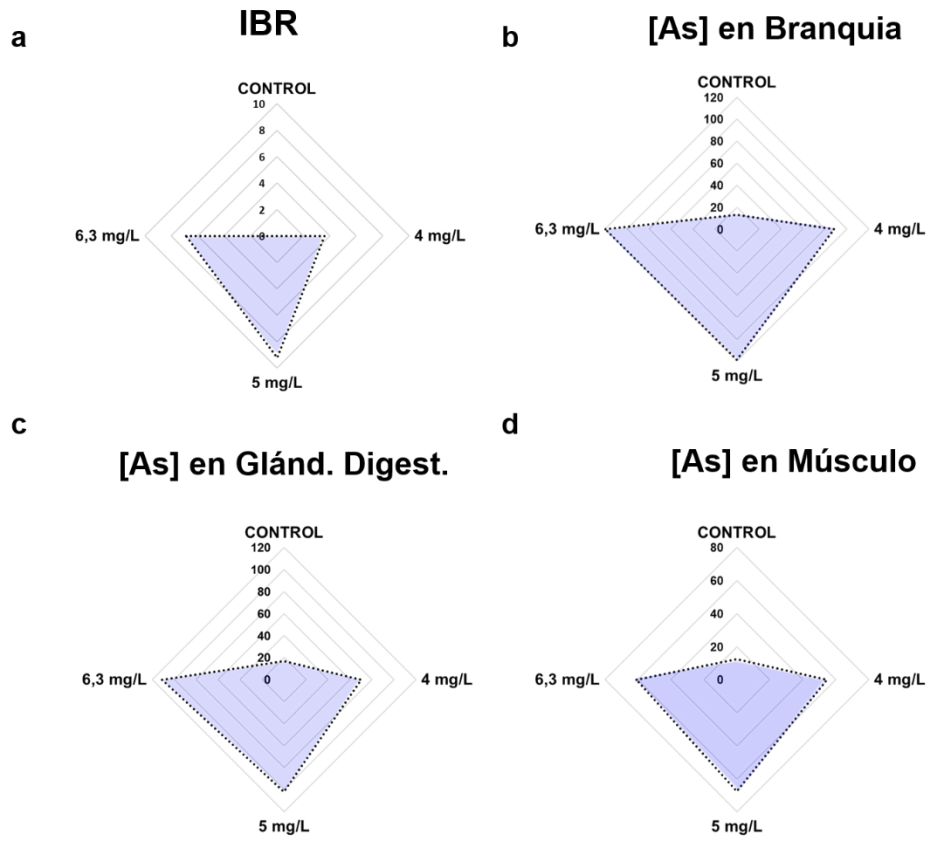


Fig. 19. IBR a diferentes concentraciones de exposición de As (a); acumulación de As en branquia (b), glándula digestiva (c) y músculo (d) de *A. tehueltchus*.

4.2. ENSAYOS SUBLETALES

4.2.1. Acumulación de As en *A. tehuelchus* expuestas 7 y 14 días

En la figura **Fig. 20** se muestra la acumulación de As en los tres tejidos analizados al inicio del experimento ($T = 0$), a los 7 ($T = 7$) y a los 14 ($T = 14$) días de exposición a 0, 125, 500 y 1000 $\mu\text{g As/L}$. Para los tres tejidos, las mayores acumulaciones se registraron en los organismos expuestos a concentración más alta de As. A los 7 y 14 días, para las exposiciones de 500 y 1000 $\mu\text{g As/L}$, se observaron diferencias significativas en los niveles acumulados por la branquia y la glándula digestiva respecto del control. Este mismo patrón se observó para el músculo, pero únicamente en la exposición a 1000 $\mu\text{g As/L}$. Como fue mencionado previamente, en el músculo aductor la acumulación suele ser menor que en otros tejidos, ya que es un órgano que no posee una función de absorción o secreción. La glándula digestiva sería el principal órgano blanco de As y la branquia el órgano de primer contacto y vía de ingreso del tóxico al organismo (Sarkar y col., 2008).

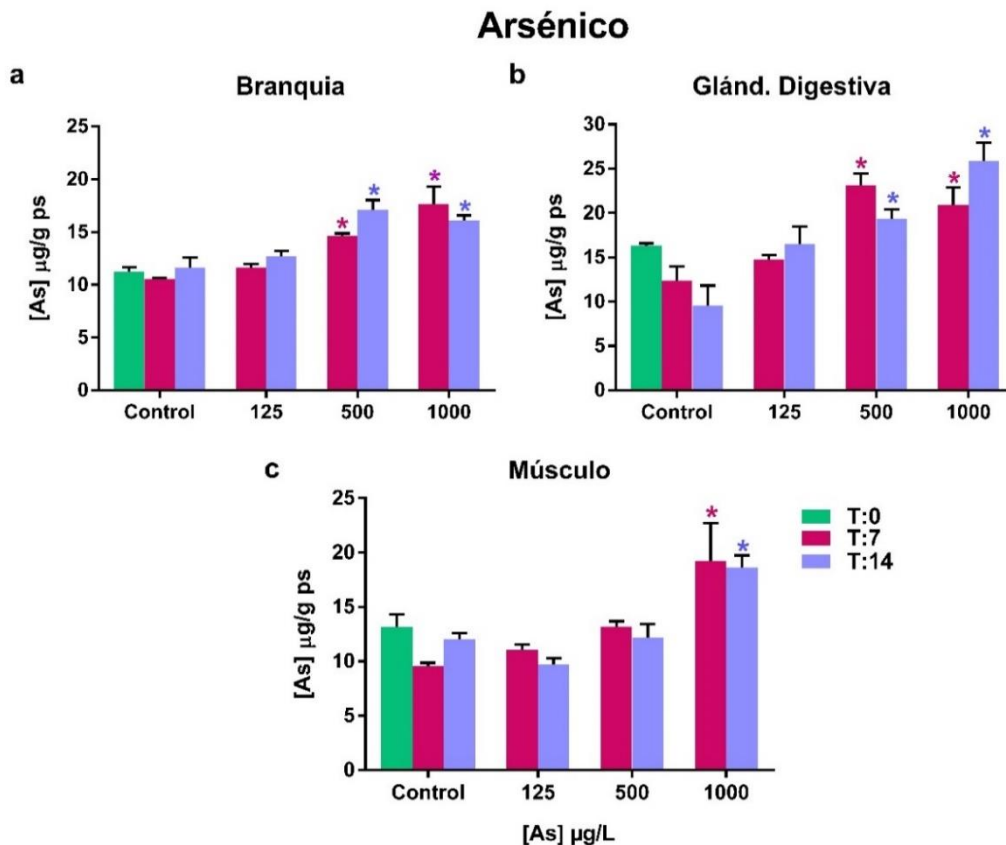


Fig. 20. Acumulación de As en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* analizados al inicio de experimento ($T = 0$), a los 7 ($T = 7$) y 14 ($T = 14$) días de exposición en todos los tratamientos.

Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tiempo (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$).

En la **Tabla 9** se muestran los resultados del análisis de ANOVA dos factores para evaluar el efecto de la concentración de As y del tiempo de exposición en la acumulación de As en los tejidos de *A. tehuelchus*. En los tres tejidos se observaron interacciones entre los dos factores analizados, lo que significa que tanto la concentración de exposición como el tiempo influyen en la acumulación de As en cada tejido.

Tabla 9. ANOVA dos factores: efecto de la concentración y tiempo de exposición de As en biomarcadores y acumulación de As en *A. tehuelchus*.

	Factores/interacción		
	[As]	T	[As] x T
Branquia	F(3,24) = 21,49 p < 0,00001	F(2,24) = 21,74 p < 0,00001	F(6,24) = 6,75 p = 0,00028
Glándula Digestiva	F(3,24) = 21,66 p < 0,00001	F(2,24) = 1,57 p = 0,23	F(6,24) = 7,56 p = 0,0001
Músculo	F(3,24) = 12,68 p = 0,00004	F(2,24) = 0,14 p = 0,87	F(6,24) = 3,99 p = 0,0065

Las diferencias significativas se muestran en negrita.

En la **Tabla 10** se presentan las correlaciones entre la exposición y la acumulación de As en cada tejido analizado. En los ensayos subletales a los 7 días de exposición, la acumulación en branquias y músculo mostró un muy buen ajuste lineal, y menor para la glándula digestiva. Este patrón, resultó inverso en el caso de los 14 días de exposición, donde el mejor ajuste lineal lo presentó la glándula digestiva, seguido del músculo y la branquia.

Tabla 10. Coeficiente de determinación entre niveles de exposición y acumulación de As en branquia, glándula digestiva y músculo de *A. tehuelchus* luego de exposiciones crónicas de 7 y 14 días (0; 125; 500; 1000 µg As/L).

Tratamiento As	Tejido	Coefficiente de determinación (R ²)	Ecuación con mejor ajuste	p
Subletal (7 d)	Branquia	0,995	0,010 x + 10,516	0,00004
	Glándula Digestiva	0,627	0,010 x + 14,175	0,00851
	Músculo	0,976	0,009 x + 9,464	0,00111
Subletal (14 d)	Branquia	0,664	0,005 x + 12,313	0,00597
	Glánd. Digestiva	0,902	0,014 x + 11,999	0,00031
	Músculo	0,793	0,008 x + 10,059	0,00086

En experiencias similares de exposición a As, Velez y col. (2016b) hallaron que el tejido blando de las almejas *R. philippinarum* y *R. decussatus* tendía a aumentar la acumulación de As al aumentar los niveles de exposición. Coppola y col. (2018) demostraron que en *M. galloprovincialis* expuestos a 1000 µg As/L durante 14 días (condiciones similares al presente trabajo) presentaron una acumulación de 1,99 – 2,32 µg/g ps. Estos resultados son inferiores respecto a los niveles acumulados en los tejidos de vieiras *A. tehuelchus*. En otro estudio realizado en la almeja *Corbicula fluminea* expuesta a concentraciones similares a las de esta tesis, se encontró un incremento significativo después de 28 días de exposición en función de los diferentes tratamientos (Diniz y col., 2008). Moreira y col. (2018) encontraron que juveniles de las ostras *Crassostrea angulata* y *Crassostrea gigas* expuestas durante 28 días a 500 µg As/L acumularon entre 15 y 22,5 µg/g ps, valores que se encuentran en el mismo orden de magnitud de los encontrados en la presente tesis. En los trabajos mencionados, como en la mayoría de la bibliografía disponible, no se realiza un análisis de la distribución tisular del As acumulado, sino que se analiza en el tejido blando completo del organismo. Esto puede deberse a la escasa masa de cada tejido que presentan los bivalvos, lo cual dificulta el análisis químico de la acumulación individualmente. A ello se suma la dificultad intrínseca de realizar comparaciones entre especies, la edad de los individuos estudiados, las diferencias de las condiciones de experimentación, la forma química en que se administra el tóxico, entre otros varios factores.

4.2.2. Indicadores de estrés oxidativo

Los resultados de los biomarcadores se presentan por tejido en función de la concentración y del tiempo de exposición (**Fig. 21- Fig. 26**). Además, en la **Tabla 11** se muestran los resultados del análisis de ANOVA dos factores para evaluar el efecto de la concentración de As y del tiempo exposición en los biomarcadores, así como la posible interacción entre ambos factores para cada tejido de *A. tehuelchus*.

Las ER, analizadas a través de la velocidad de oxidación de la DCFH-DA, muestran en la branquia una clara disminución respecto a los controles en el tiempo inicial, a los 7 y 14 días de exposición (**Fig. 21 a**). En la glándula digestiva, se observa un aumento significativo respecto al control a los 7 días de exposición para la concentración de 500 µg As/L y en ambos tiempos en 1000 µg As/L (**Fig. 21 b**). En el músculo se observó una respuesta diferente, registrándose una disminución significativa a los 14

días para las concentraciones de 125 y 500 $\mu\text{g As/L}$ (**Fig. 21 c**). Si bien en la concentración mayor existe un aumento de las ER, dichas diferencias no son estadísticamente significativas respecto al control para ambos tiempos de exposición. La branquia mostró ser el tejido con mayor sensibilidad a la presencia de Cd probablemente debido a su permanente contacto con el tóxico y generando respuestas rápidas en la producción de ER. La glándula digestiva y el músculo revelaron una menor sensibilidad, sobre todo en las menores concentraciones de exposición.

Tabla 11. ANOVA dos factores: efecto de la concentración y tiempo de exposición de As en biomarcadores en *A. tehuelchus*.

		Factores/interacción		
		[As]	T	[As] x T
Branquias	ER	F(3,24) = 24,63 p < 0,00001	F(2,24) = 237,33 p < 0,00001	F(6,24) = 11,21 p < 0,00001
	CAT	F(3,24) = 16,08 p < 0,00001	F(2,24) = 40,04 p < 0,00000	F(6,24) = 14,86 p < 0,00001
	GST	F(3,24) = 12,87 p = 0,00003	F(2,24) = 0,49 p = 0,618	F(6,24) = 4,09 p = 0,0057
	MT	F(3,24) = 55,23 p < 0,00001	F(2,24) = 108,16 p < 0,00001	F(6,24) = 15,07 p = 0,00008
	TBARS	F(3,24) = 0,68 p = 0,575	F(2,24) = 1,65 p = 0,216	F(6,24) = 0,12 p = 0,943
	α -T	F(3,24) = 94,89 p < 0,00001	F(2,24) = 46,07 p < 0,00001	F(6,24) = 30,54 p < 0,00001
	TBARS/ α -T	F(3,24) = 21,95 p < 0,00001	F(2,24) = 1,08 p = 0,314	F(6,24) = 3,40 p = 0,043
Glándula digestiva	ER	F(3,24) = 6,88 p = 0,0016	F(2,24) = 11,01 p = 0,0004	F(6,24) = 2,55 p = 0,046
	CAT	F(3,24) = 27,14 p < 0,00001	F(2,24) = 61,26 p < 0,00001	F(6,24) = 12,71 p < 0,00001
	GST	F(3,24) = 3,11 p = 0,04	F(2,24) = 12,8 p = 0,00019	F(6,24) = 2,03 p = 0,10
	MT	F(3,24) = 17,90 p < 0,00001	F(2,24) = 8,78 p = 0,0091	F(6,24) = 8,13 p = 0,0016
	TBARS	F(3,24) = 2,78 p = 0,075	F(2,24) = 2,01 p = 0,175	F(6,24) = 1,13 p = 0,365
	α -T	F(3,24) = 8,94 p = 0,00037	F(2,24) = 2,27 p = 0,12	F(6,24) = 3,22 p = 0,01
	TBARS/ α -T	F(3,24) = 2,78 p = 0,075	F(2,24) = 2,01 p = 0,175	F(6,24) = 1,13 p = 0,365
Músculo	ER	F(3,24) = 4,24 p = 0,015	F(2,24) = 7,09 p = 0,0038	F(6,24) = 1,28 p = 0,3044
	CAT	F(3,24) = 14,65 p = 0,00001	F(2,24) = 4,75 p = 0,018	F(6,24) = 5,60 p = 0,00094
	GST	F(3,24) = 9,60 p = 0,0002	F(2,24) = 2,59 p = 0,095	F(6,24) = 4,44 p = 0,0037
	MT	F(3,24) = 0,14 p = 0,93	F(2,24) = 3,53 p = 0,045	F(6,24) = 0,24 p = 0,957
	TBARS	F(3,24) = 3,54 p = 0,038	F(2,24) = 0,99 p = 0,34	F(6,24) = 3,93 p = 0,028
	α -T	F(3,24) = 1,30 p = 0,30	F(2,24) = 0,06 p = 0,94	F(6,24) = 1,29 p = 0,30
	TBARS/ α -T	F(3,24) = 4,85 p = 0,014	F(2,24) = 1,08 p = 0,315	F(6,24) = 5,47 p = 0,009

Las diferencias significativas se muestran en negrita.

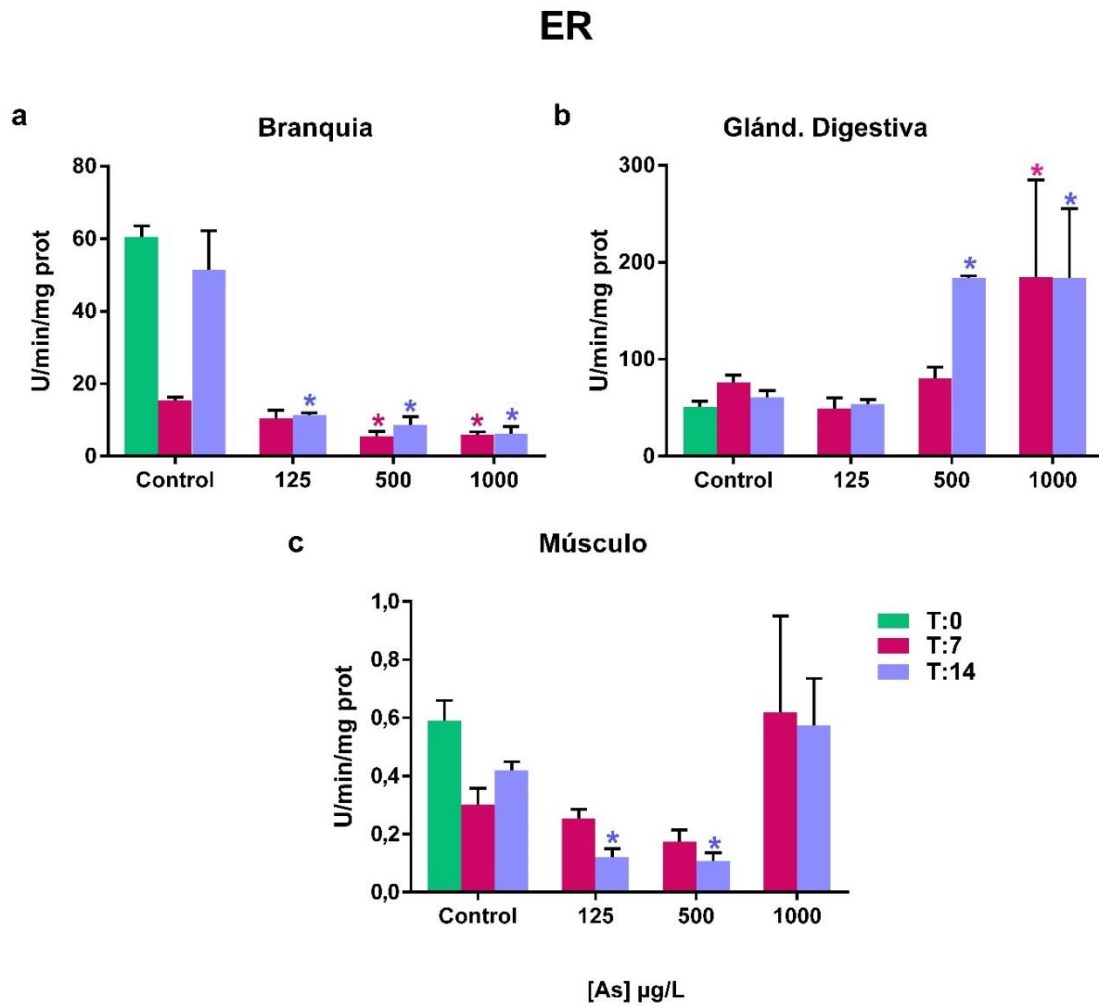


Fig. 21. ER en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de As. Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tiempo (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$).

La actividad de CAT en branquias se vio inducida en todas las concentraciones ensayadas a los 7 días de exposición y solo en la concentración intermedia en el día 14 (**Fig. 22 a**). En la glándula digestiva fue significativamente mayor en todas las concentraciones y tiempos de exposición respecto a los controles, a excepción de la concentración más alta a los 7 días de exposición (**Fig. 22 b**). En el músculo, se observó la tendencia opuesta, siendo significativamente menor en todas las concentraciones ensayadas para los 7 días de exposición y, en la concentración de 500 $\mu\text{g As/L}$ para los 14 días de exposición (**Fig. 22 c**).

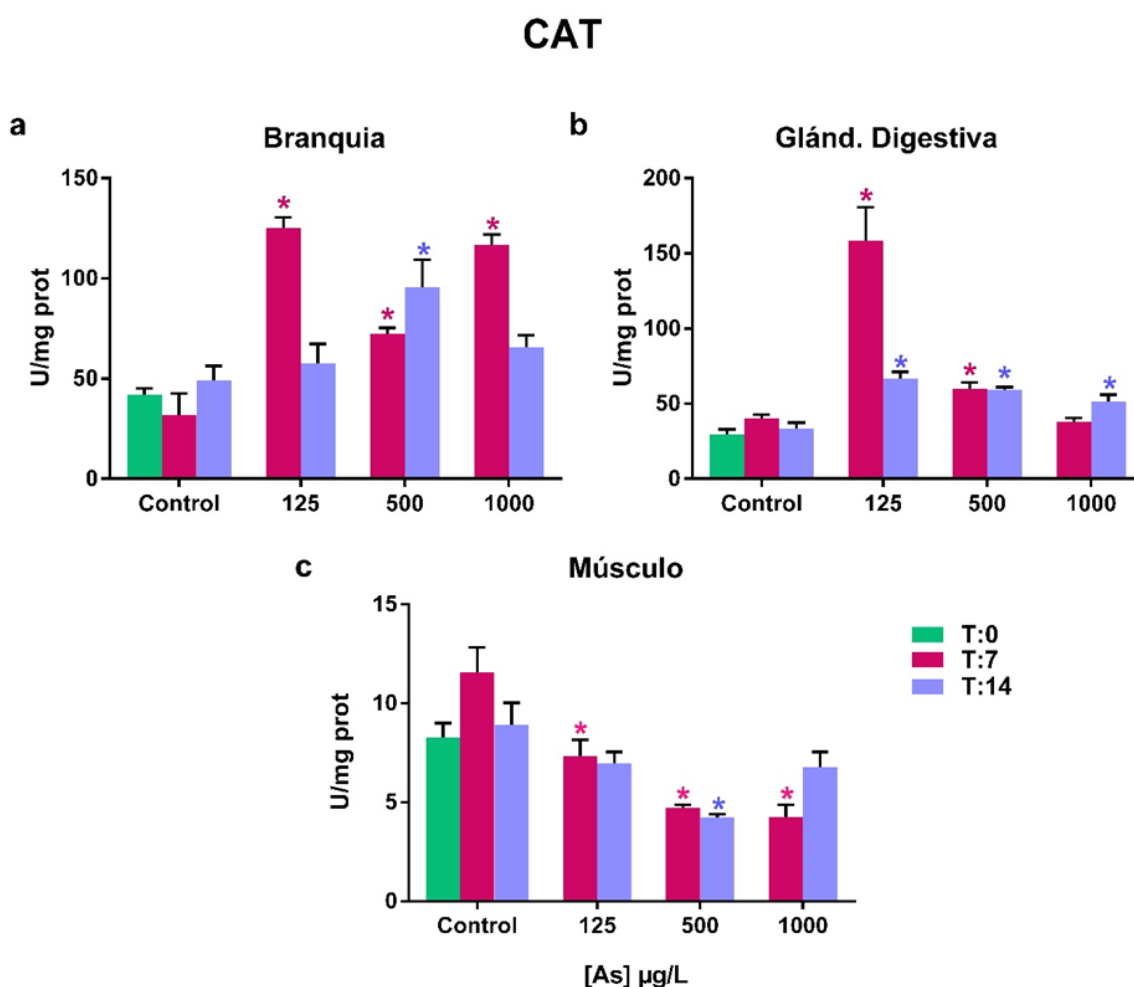


Fig. 22. Actividad de CAT en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de As.

Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tiempo (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$).

La actividad de GST en branquias presentó una disminución significativa en la concentración más baja en ambos periodos de exposición. Si bien se observa una

tendencia de incremento en las concentraciones más altas, no fue significativa respecto a los controles (**Fig. 23 a**). En la glándula digestiva se observa un patrón similar, pero con una disminución significativa solo a los 7 días de exposición y un aumento en la concentración más alta a los 14 días de tratamiento (**Fig. 23 b**). De manera similar a la actividad de CAT, el músculo presentó un patrón totalmente opuesto al de los otros tejidos con un aumento significativo en la actividad de GST en la menor concentración ensayada a los 14 días de exposición (**Fig. 23 c**).

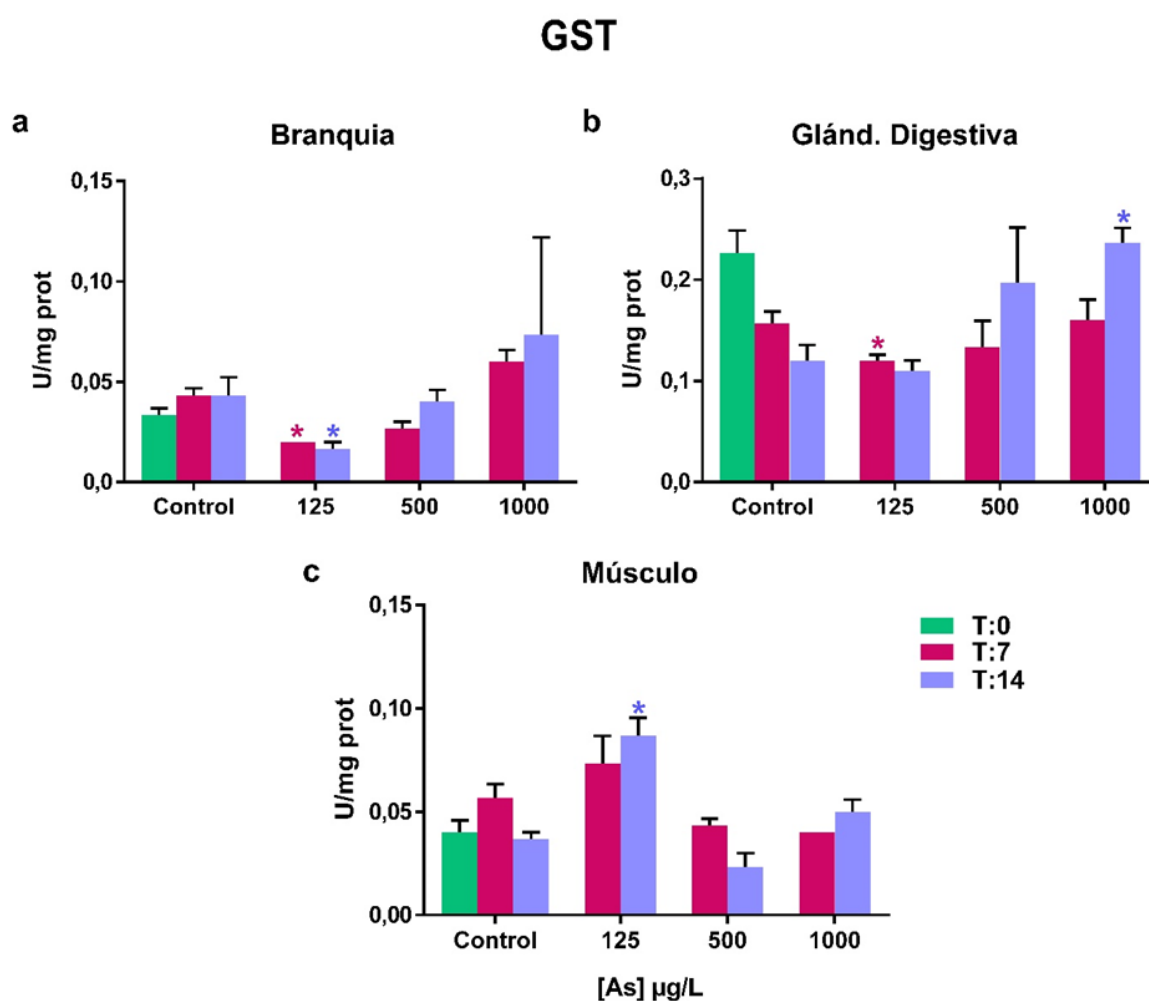


Fig. 23. Actividad de GST en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de As.

Los resultados se expresan como media \pm ES (n=3). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tiempo (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$).

Las MT en las branquias y en la glándula digestiva registraron diferencias significativas respecto al control en todas las concentraciones y tiempos ensayados (**Fig. 24 a y b**), pero no entre tratamientos de exposición. Por otro lado, en el músculo no se hallaron diferencias significativas en ningún caso respecto al control (**Fig. 24 c**).

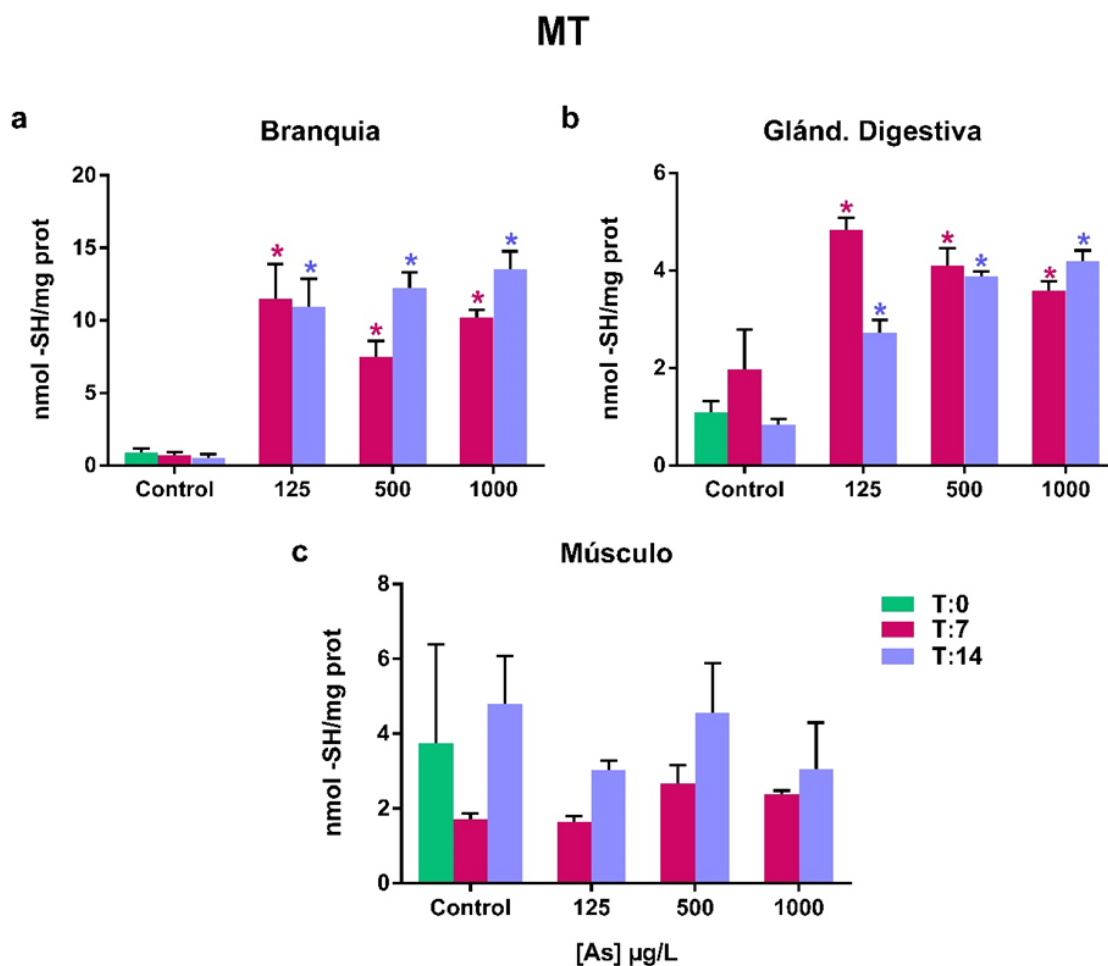


Fig. 24. Contenido de MT en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de As.

Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tiempo (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$).

El daño a lípidos, analizado a través de los TBARS, no presentó diferencias significativas respecto al control en ninguno de los tres tejidos analizados excepto en el músculo a los 7 días de exposición para 125 y 1000 µg As/L (**Fig. 25**).

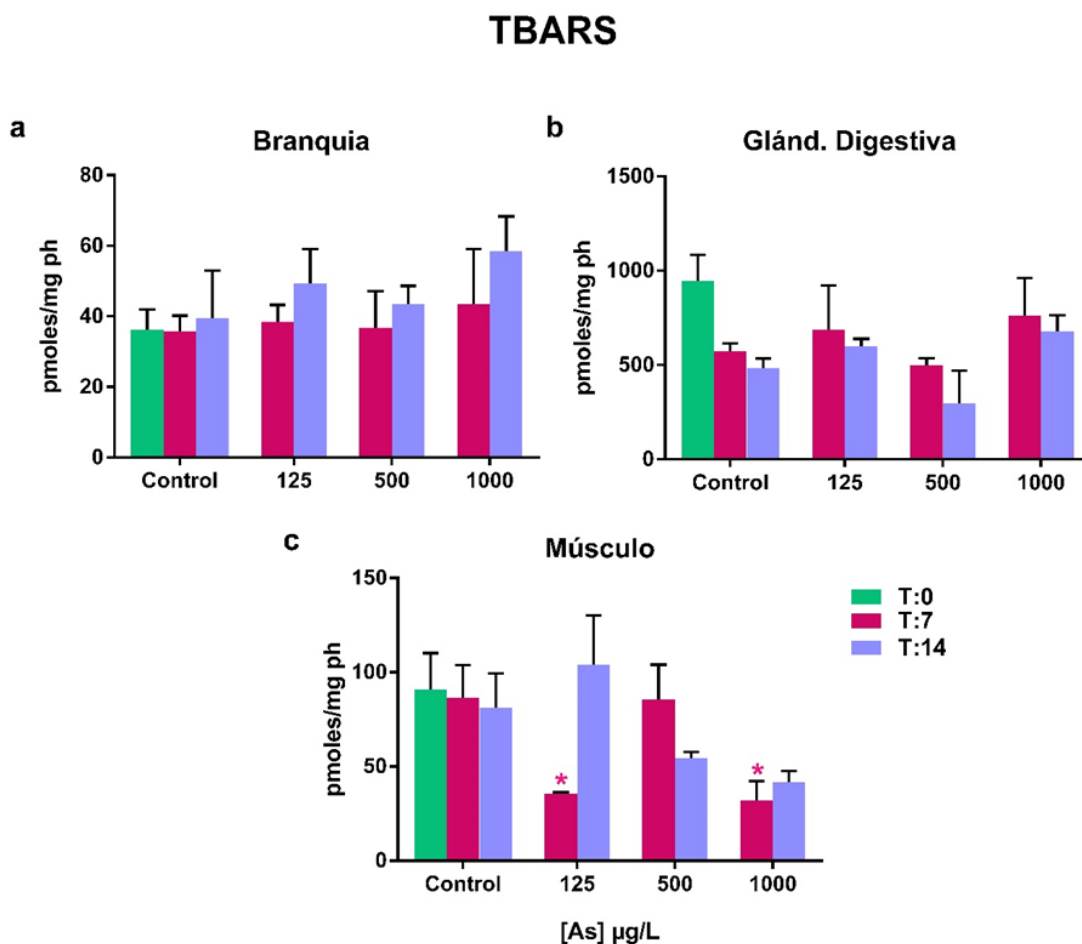


Fig. 25. TBARS en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de As.

Los resultados se expresan como media \pm ES (n=3). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tiempo (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$).

Los niveles de α -T en la branquia registraron aumentos significativos en todos los tiempos y concentraciones (**Fig. 26 a**). Considerando que estos organismos no producen α -T sino que lo obtienen exclusivamente de su dieta y que no se suministró alimento durante los experimentos, el aumento registrado en las branquias podría deberse a una redistribución del antioxidante desde otros tejidos, aunque no existe bibliografía que confirme dicho comportamiento para estos grupos. La glándula digestiva no presentó diferencias significativas respecto al control, excepto una disminución con 500 μ g As/L a los 14 días. En cuanto al músculo, los niveles de α -T disminuyeron significativamente a los 7 días de exposición respecto al control en todas las concentraciones.

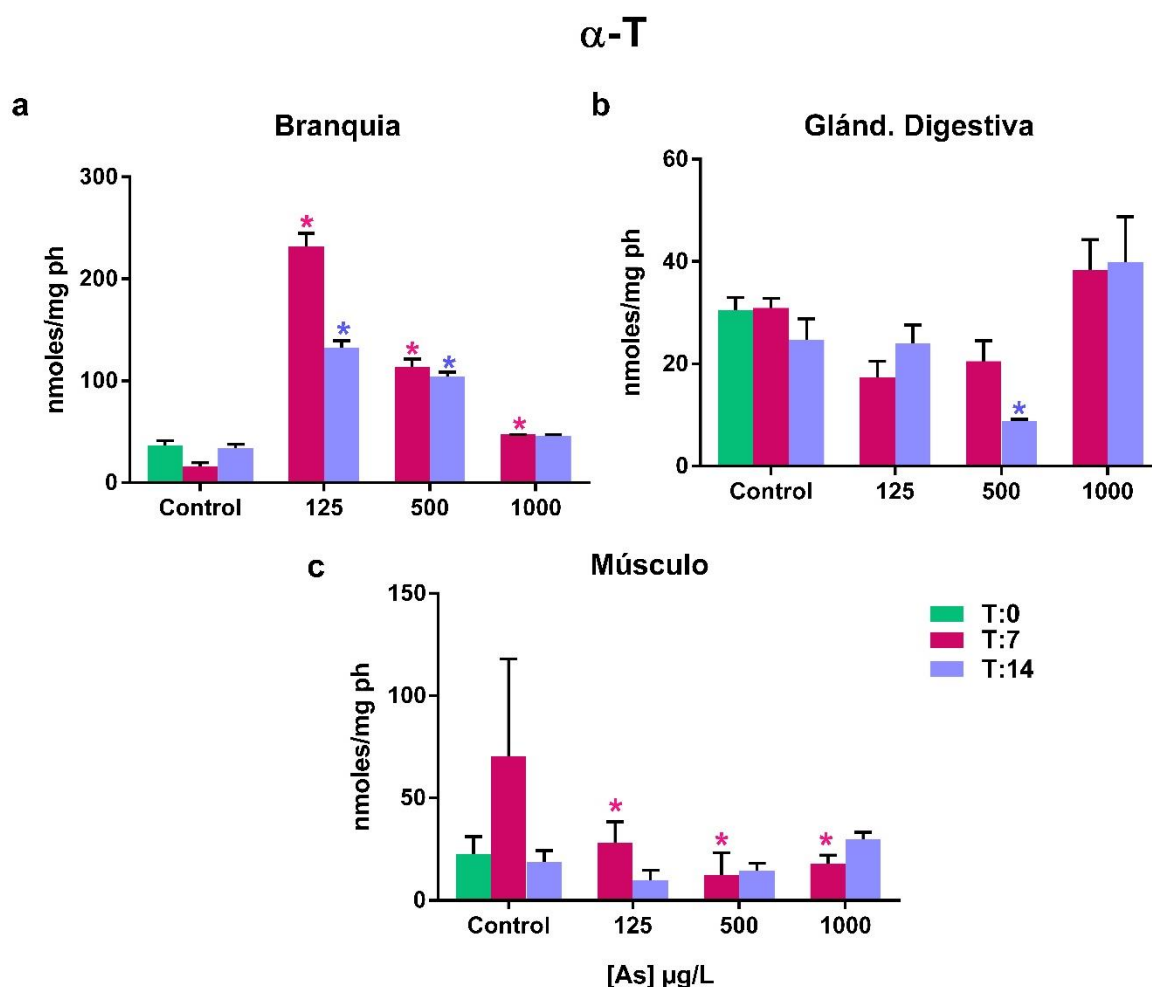


Fig. 26. Contenido α -T en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de As.

Los resultados se expresan como media \pm ES (n=3). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tiempo (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$).

A través de la relación TBARS/ α -T (**Tabla 12**) se analizó el equilibrio entre el daño a lípidos provocado por la exposición al As y la protección antioxidante en la fase lipídica. En la branquia se registraron reducciones significativas de este índice en las concentraciones de 125 y 500 μ g As/L solo a los 7 días de exposición, mientras que en la glándula digestiva no hubo diferencias significativas en ningún caso y, en el músculo, se observó un aumento significativo en las mencionadas concentraciones, pero a los 14 días de exposición. Una disminución del índice respecto al control podría implicar tanto una disminución del daño, como un aumento en los antioxidantes o una combinación de ambas situaciones. En la glándula digestiva, como se mencionó anteriormente, el índice no presentó diferencias significativas respecto al control,

debido principalmente a las escasas diferencias entre los niveles de TBARS y α -T entre los tratamientos de exposición y el control. Sin embargo, cabe mencionar que este índice en dicho órgano es particularmente alto respecto a los otros tejidos analizados. Por lo tanto, la glándula digestiva presentaría altos niveles basales de TBARS, incluso en condiciones de bajo estrés y, el consumo de antioxidantes como el α -T, no sería el mecanismo para su regulación.

Tabla 12. Relación TBARS/ α -T en branquia, glándula digestiva y músculo de *A. tehuelchus* para los cuatro tratamientos a 0, 7 y 14 días de experimentación. Los resultados se expresan como media \pm ES (n=3).

	Tratamiento	Tiempo	Branquia	Glándula digestiva	Músculo
TBARS/ α -T (10^{-3})	Control	0 d	1,06 \pm 0,28	31,79 \pm 6,33	5,91 \pm 2,39
		7 d	2,52 \pm 0,83	18,68 \pm 2,13	2,49 \pm 1,19
		14 d	1,09 \pm 0,27	20,02 \pm 1,86	4,70 \pm 0,72
	125 μ g/L	7 d	0,17 \pm 0,01*	37,36 \pm 5,85	2,17 \pm 1,26
		14 d	0,38 \pm 0,09	25,69 \pm 2,86	16,68 \pm 6,24*
	500 μ g/L	7 d	0,32 \pm 0,09*	25,77 \pm 3,94	29,60 \pm 14,24*
		14 d	0,42 \pm 0,06	32,43 \pm 17,96	4,37 \pm 1,49
	1000 μ g/L	7 d	0,92 \pm 0,33	20,89 \pm 6,66	1,68 \pm 0,40
		14 d	1,3 \pm 0,23	18,12 \pm 2,93	1,45 \pm 0,31

Los asteriscos denotan diferencias significativas entre cada tratamiento respecto al control para cada tiempo de exposición (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$).

4.2.3. IBR en experimentos subletales con As

A través del modelo de árboles de regresión reforzado (BRT) se seleccionaron para el cálculo del IBR: ER, CAT y GST en branquia, CAT en glándula digestiva y en músculo para 7 días de exposición y GST y α -T en branquia, GST, MT y TBARS en glándula digestiva y GST en músculo para los 14 días de exposición. Los valores obtenidos de IBR a 7 y 14 días de exposición se presentan en la **Fig. 27** y **Tabla 13**. En los gráficos de estrella, el área en gris integra los valores para cada concentración ensayada.

Se observaron diferencias significativas de los valores de IBR entre todas las concentraciones de exposición respecto al control y para los tres tiempos considerados (inicial, 7 y 14 días). Los mayores valores de IBR se registraron a los 7 y a los 14 días

de exposición en la concentración más alta ensayada. Sin embargo, a los 7 días de exposición, la concentración de 125 µg As/L presentó mayor índice que la de 500 µg As/L.

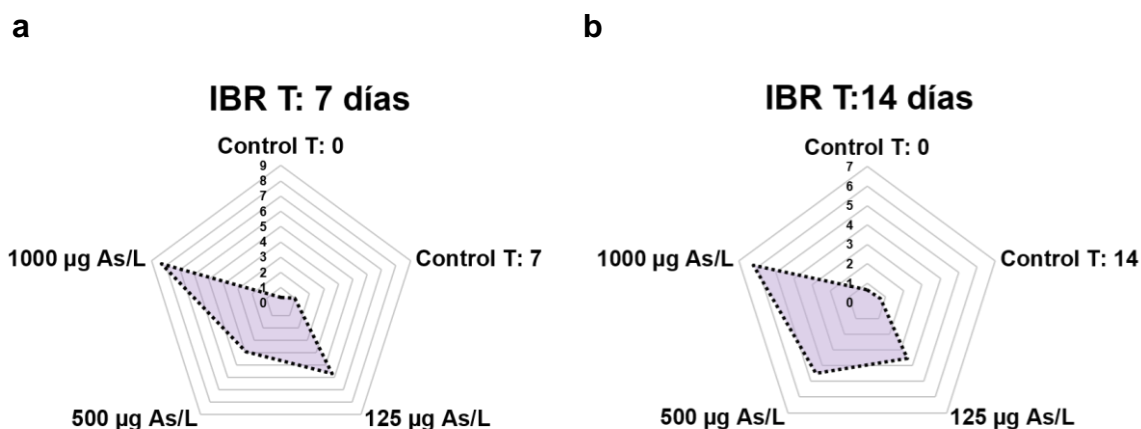


Fig. 27. IBR a diferentes concentraciones de exposición de As durante 7 (a) y 14 (b) días en *A. tehuelchus*.

A los 14 días de exposición se observa un aumento gradual del IBR en función de la concentración de exposición lo que indicaría que diversos mecanismos de defensa están siendo activados para mitigar el efecto de la exposición a concentraciones crecientes de As.

Tabla 13. IBR a diferentes concentraciones de As durante 7 y 14 días de exposición en *A. tehuelchus*. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA - Test de Tukey; $p < 0,05$). DE: desvío estándar.

	Índice IBR							
	T: 7 días				T: 14 días			
	Media	DE	Min	Max	Media	DE	Min	Max
Control (T:0 d)	0,65 ^a	0,19	0,12	0,59	0,65 ^a	0,28	0,14	1,20
Control (T:7/14 d)	0,97 ^a	0,76	0,17	1,78	0,72 ^a	0,38	0,12	1,43
125 µg As/L	5,73 ^c	0,45	5,11	6,36	3,54 ^b	0,95	1,92	5,31
500 µg As/L	3,92 ^d	0,68	3,13	4,71	4,51 ^c	0,62	3,32	5,67
1000 µg As/L	8,30 ^e	0,24	8,02	8,58	6,24 ^d	0,61	5,09	7,43

4.3. CORRELACIONES ENTRE As, BIOMARCADORES E IBR

4.3.1. Niveles de As acumulado y biomarcadores de estrés oxidativo

En la **Tabla 14** se presentan los coeficientes de correlación entre los biomarcadores y la acumulación de As por 96 h para los tres tejidos analizados. En la branquia, solo hubo correlación positiva significativa con los α -T. En la glándula digestiva las actividades de CAT y GST y los niveles de MT correlacionaron positivamente con la acumulación de As, mientras que los niveles de α -T presentaron una correlación negativa. En el músculo, la actividad de CAT se correlacionó positivamente, mientras que los niveles de MT y α -T lo hicieron negativamente. La marcada asociación negativa entre el nivel de As acumulado y el α -T en glándula digestiva y músculo es la esperable ya que, ante la presencia de un tóxico, los niveles de antioxidantes liposolubles son consumidos con el fin de mitigar los posibles daños producidos por las especies reactivas. En cuanto a la correlación positiva entre el As acumulado y las MT en glándula digestiva, puede explicarse teniendo en cuenta que la expresión de las MT se activa como una respuesta específica a la toxicidad del metal(oide) y también como defensa antioxidante para secuestrar los iones metálicos (Viarengo y col., 1999).

Tabla 14. Coeficiente de correlación entre los niveles de As acumulados en cada tejido y los biomarcadores analizados a las 96 h de exposición.

[As]		Biomarcador					
		ER	CAT	GST	MT	TBARS	α -T
Branquia	R ²	-0,318	0,423	0,223	0,425	0,231	0,950
	p	0,313	0,171	0,485	0,169	0,469	0,0001
Glándula digestiva	R ²	0,130	0,881	0,643	0,667	0,195	-0,809
	p	0,688	<0,0001	0,018	0,018	0,545	0,001
Músculo	R ²	-0,304	0,701	0,096	-0,877	-0,149	-0,808
	p	0,336	0,010	0,766	0,0001	0,644	0,001

Los números en negrita indican correlaciones significativas a $p < 0,05$.

En la **Tabla 15** se observan las correlaciones entre los niveles de As acumulados en cada tejido y la respuesta de los biomarcadores para los experimentos subletales. En estos ensayos de larga duración, a los 7 días de exposición solo hubo dos correlaciones significativas negativas (ER en branquia y CAT en músculo) y a los 14

días hubo mayor cantidad de correlaciones. De este modo, si bien a los 7 días ya se observa acumulación de As en los tejidos, recién a los 14 días de exposición los organismos estarían respondiendo a la presencia del tóxico en el tejido.

Tabla 15. Coeficiente de correlación entre los niveles de As y los biomarcadores analizados a los 7 y 14 días de exposición.

[As]	Tiempo		Biomarcador					
			ER	CAT	GST	MT	TBARS	α -T
Branquia	7 d	R ²	-0,768	0,471	0,460	0,474	0,168	-0,217
		p	0,004	0,122	0,132	0,119	0,601	0,499
	14 d	R ²	-0,688	0,690	0,221	0,739	0,190	0,108
		p	0,013	0,013	0,489	0,006	0,554	0,739
Glándula digestiva	7 d	R ²	0,284	-0,284	0,032	0,359	-0,037	0,047
		p	0,371	0,370	0,920	0,252	0,908	0,179
	14 d	R ²	0,627	0,439	0,672	0,929	0,237	0,320
		p	0,029	0,152	0,017	0,0001	0,458	0,310
Músculo	7 d	R ²	0,470	-0,735	-0,557	0,481	-0,446	-0,346
		p	0,123	0,006	0,060	0,113	0,146	0,270
	14 d	R ²	0,704	-0,028	-0,218	-0,139	-0,608	0,752
		p	0,11	0,931	0,495	0,665	0,036	0,005

Los números en negrita indican correlaciones significativas a $p < 0,05$.

4.3.2. Acumulación de As, niveles de exposición e IBR

Con el fin de determinar la correlación de los niveles de exposición y acumulación en cada tejido e IBR obtenidos, se realizaron correlaciones de Pearson para cada tejido (Tabla 16). Las fuertes correlaciones significativas positivas entre la exposición al metaloide y la acumulación en cada órgano demuestran la alta capacidad de incorporación y retención del tóxico tanto a corto plazo (96 h) como a mediano plazo de exposición (7 y 14 d). De la misma manera, el IBR presentó correlaciones significativas en todos los tejidos en al menos dos tiempos de exposición.

Tabla 16. Coeficiente de correlación entre los niveles de As acumulados en cada tejido y la exposición a As y el IBR.

	Tiempo		Tejido		
			Branquia	Glándula digestiva	Músculo
Concentración de exposición	96 h	R ²	0,91	0,95	0,76
		p	0,00001	0,00001	0,00001
	7 d	R ²	0,91	0,78	0,75
		p	0,00001	0,005	0,001
	14 d	R ²	0,76	0,80	0,78
		p	0,001	0,00001	0,01
IBR	96 h	R ²	0,85	0,83	0,84
		p	0,00001	0,00001	0,00001
	7d	R ²	0,74	0,47	0,58
		p	0,02	0,08	0,024
	14 d	R ²	0,84	0,77	0,45
		p	0,00001	0,001	0,09

Los números en negrita indican correlaciones significativas a $p < 0,05$.

4.4. ENSAYOS AGUDOS VS. CRÓNICOS

Se ha encontrado que altos niveles de metal(oid)es en el agua dañan la vida marina al reducir las tasas de división celular, aumentar el daño oxidativo, interferir con eventos celulares y causar la muerte celular provocando daños en las branquias, el hígado o glándula digestiva, los riñones y los sistemas nerviosos (Ji y col., 2019). A bajas concentraciones, la exposición crónica en agua o sedimentos contaminados con metal(oid)es puede resultar en un crecimiento reducido, cambios en la abundancia y composición taxonómica de la fauna (Fleeger y col., 2003). Además, la adaptación a la contaminación crónica puede dar lugar a situaciones de baja o nula respuesta o al desarrollo de tolerancia a los tóxicos (Shaw y col., 2002; Wu y col., 2005).

En el GSJ la biota se encuentra naturalmente expuestas a niveles bajos de As comparado a otros sitios, pudiendo generar cierta resistencia o adaptación de las diferentes poblaciones y, por lo tanto, diferir en las respuestas bioquímicas frente a una exposición crónica respecto de una aguda. En términos generales, el comportamiento de los biomarcadores en los ensayos agudos y crónicos realizados en la presente tesis, tuvieron tendencias de aumento de CAT y MT y sin respuesta de GST ni TBARS, pero difirieron en la producción de ER y α -T. En el ensayo agudo se observó una

disminución de α -T y sin variaciones en la producción de ER, evidenciando una óptima función de los antioxidantes. Por otro lado, en los experimentos crónicos no hubo variaciones en los niveles de α -T, y por lo tanto se produjo un aumento de ER. Las diferencias en las respuestas de ambos tipos de experimentos, podría estar explicada por la continua, pero baja exposición a As a la que naturalmente se encuentran estas poblaciones. Ello le confiere una alta capacidad de respuesta ante una exposición puntual en un corto período, pero que sostenida en el tiempo generaría un deterioro de dicha capacidad, aumentando los niveles de ER. El continuo estrés al que están sometidos los organismos a exposiciones naturales, les confiere la capacidad de mantenerse en estado de salud óptimo, aun en caso de exposiciones puntuales altas, pero por cortos periodos de tiempo y si la exposición se mantiene en el tiempo, dicho estrés aumenta, generando daños en el organismo y la población en general. Por lo tanto, las comparaciones directas entre las poblaciones nativas recolectadas de diferentes áreas siempre deben hacerse teniendo en cuenta los antecedentes de exposición (Rank y col., 2007).

4.5. CONSIDERACIONES FINALES: EFECTO DEL As EN A. TEHUELCHUS

En esta tesis se han determinado valores de CL_{50} 96 h muy por encima de los valores reportados en otras especies de pectínidos. Azizi y col. (2018) han sugerido aumento de tolerancia en especies con historia previa de exposición a ciertos contaminantes, pudiendo ser la causa de los altos valores obtenidos en *A. tehuelchus*.

Respecto a la acumulación de As en los tejidos de la vieira tehuelche, tanto en la exposición de 96 h con concentraciones altas como en aquellas de 7 y 14 días con concentraciones menores, se registraron aumentos lineales significativos del metaloide respecto al control y entre concentraciones crecientes. La aplicación de un modelo cinético de primer orden muestra que el proceso de acumulación del As en los tiempos de exposición ensayados no tiende a un estado de saturación en los tejidos analizados.

A través del análisis de biomarcadores bioquímicos se pudieron determinar tendencias generales en los efectos biológicos sobre *A. tehuelchus* expuesta a As (**Fig. 28**). De esta forma, si los efectos celulares del As siguieron una etiología lineal simple a lo largo del tiempo, entonces podría esperarse inducción de ER, seguido de

activación de mecanismos para quelar el metaloide, cambios en las defensas antioxidantes enzimáticas (SOD, CAT y GST) y no enzimáticas (α -T) y, finalmente, el daño a macromoléculas (LPO) cuando las MT y otros quelantes celulares no resultaran suficientes para evitar el daño. En general, el estrés oxidativo de *A. tehuelchus* expuestas a As se manifestó con distintas tendencias en función de las concentraciones y tiempos de exposición (ensayo letal vs. subletal). Las ER solo aumentaron en la glándula digestiva en la experiencia subletal, mientras que en las exposiciones cortas y a mayores concentraciones no hubo cambios significativos. La actividad de CAT aumentó en ambos ensayos en branquia y glándula digestiva. Por otro lado, la disminución significativa en la actividad enzimática total en el músculo en la exposición subletal sugiere una menor capacidad del sistema antioxidante para superar la situación de estrés oxidativo provocada por dicho metaloide. Además, la falta de respuesta de la actividad de GST en los tres tejidos, puede ser explicada porque, dependiendo de la intensidad de la producción de especie reactivas, la capacidad antioxidante puede verse aumentada debido a la inducción de la enzima, o incluso inactivada a través de un efecto inhibitor directo sobre el grupo hemo del centro activo (Regoli y Giuliani, 2014). De manera similar a los resultados presentados en esta tesis, Guidi y col. (2010) han informado que bivalvos (*Unio pictorum*) colocados durante 4 semanas en diferentes sitios de una cuenca fluvial contaminada con metales poseen disminuida significativamente la capacidad antioxidante total.

La respuesta de las MT en ambos ensayos fue similar, registrándose un aumento significativo frente a las exposiciones (a excepción del músculo en los ensayos subletales). Éstas son agentes quelantes que responden a la presencia de metal(oides) y por lo tanto un aumento en el tejido induce la transcripción de este tipo de proteínas. Los mecanismos por los que las MT actúan contra la presencia de tóxicos están ampliamente estudiados y es probable que el As se una inicialmente a dichas proteínas secuestrantes o se incorpore a los lisosomas (Viarengo y Nott, 1993). En las branquias suele haber un almacenamiento temporal de los metal(oides) antes que se liberen a la circulación y sean transportados a través de la hemolinfa, hacia otros tejidos como la glándula digestiva, músculo y gónada. Un aumento en los niveles de MT puede haber reducido los niveles de As en el tejido para prevenir la peroxidación lipídica. Este es el caso de la branquia y glándula digestiva, donde se observan aumentos significativos de los niveles de MT, sin efecto en los niveles de TBARS.

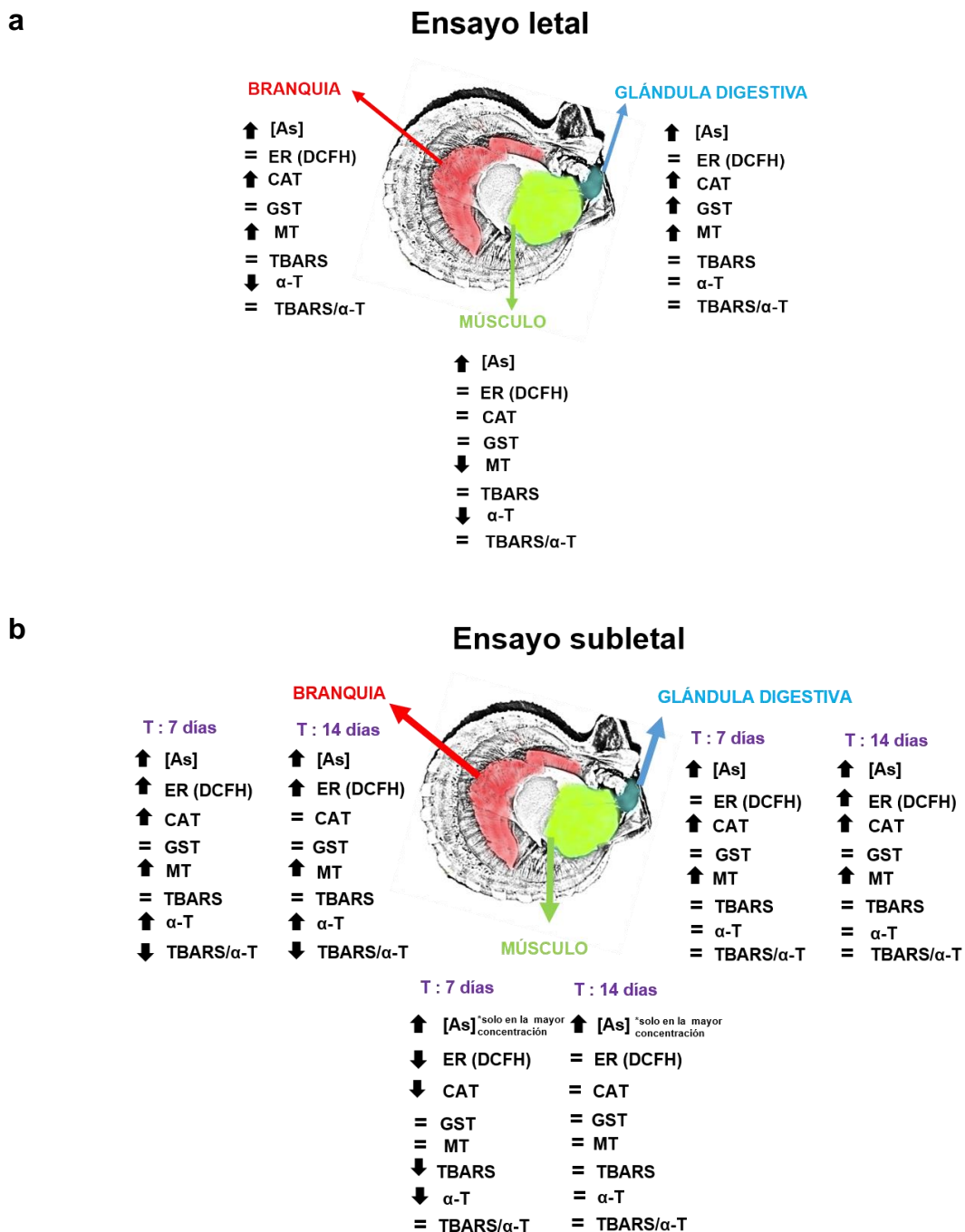


Fig. 28. Tendencia general de los efectos de concentraciones de As letales (a) y subletales (b) en branquia, glándula digestiva y músculo en *A. tehuelchus*, expuestos durante 96 h, 7 y 14 d.

El índice IBR constituye una herramienta práctica y robusta para evaluar la susceptibilidad de los organismos expuestos utilizando la respuesta de múltiples biomarcadores (Beliaeff y Burgeot, 2002). Brooks y col. (2018) obtuvieron en *Mytilus* sp. valores de IBR menores a 1 (muy por debajo a los hallados en el presente trabajo)

pero con un nivel de As en tejido blando próximo a 20 µg/g ph (un orden de magnitud menor que los registrados en esta tesis). Las correlaciones significativas y positivas entre la acumulación de As y el IBR calculado en cada concentración, evidencia que, tanto el IBR como los biomarcadores seleccionados por el modelo BRT, son pertinentes para la evaluación de ensayos de toxicidad. En términos generales, los resultados aquí presentados sugieren que el índice IBR sería una buena herramienta para la cuantificación de la respuesta de múltiples biomarcadores inducidos por As en especies como *A. tehuelchus*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
5. EFECTOS LETALES Y SUBLETALES DE CADMIO EN
AEQUIPECTEN TEHUELCHUS

Resultados y discusión: efectos de concentraciones letales y subletales de cadmio en *A. tehuelchus*

5.1. ENSAYOS DE LETALIDAD

5.1.1. Determinación de la concentración letal media (CL₅₀) de Cd

Durante el período de exposición, no hubo mortalidad en las concentraciones más bajas ensayadas (25, 50 y 100 µg Cd/L). A partir de la concentración de 150 µg Cd/L, se comenzaron a registrar muertes después de las 48 h de iniciado el experimento. Para las concentraciones más altas (275, 371 y 500 µg Cd/L) se registró prácticamente 100 % de mortalidad a las 96 h de exposición (Fig. 29).

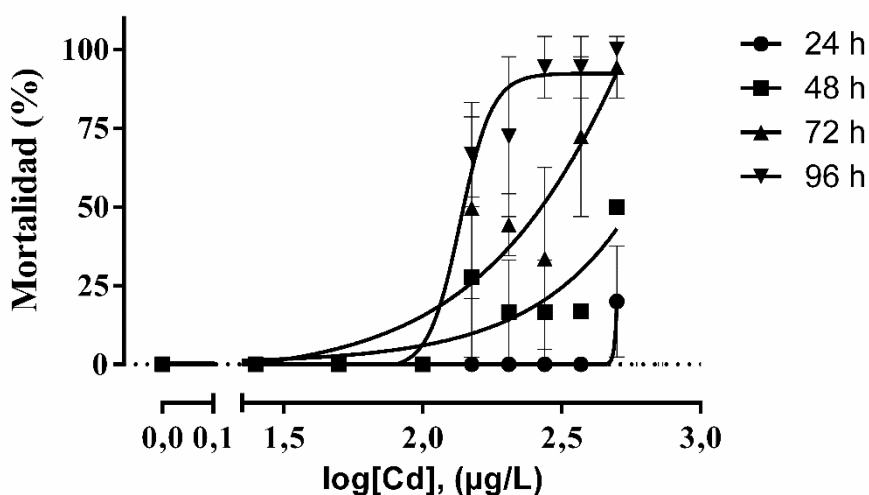


Fig. 29. Porcentaje de mortalidad en *A. tehuelchus* expuestas durante 24, 48, 72 y 96 h a 0; 25; 50; 100; 150; 204; 275; 371 y 500 µg Cd/L. Los datos corresponden a la media \pm desvío estándar de la media de cada tratamiento realizado por triplicado ($n=6$).

La CL₅₀ calculada a las 96 h fue de 155,8 µg Cd/L con intervalos de confianza al 95 % de 136,5 y 174,8 µg Cd/L. Este valor es considerablemente menor a los 1480 µg Cd/L y 396 µg Cd/L reportados para las vieiras *Argopecten irradians* (Nelson y col., 1976) y *Argopecten ventricosus* (Sobrino-Figueroa y col., 2007), respectivamente. También resultó menor a los 960 µg Cd/L reportado para el mejillón *Mytilus edulis* (Nelson y col., 1988). Las experiencias realizadas por Nelson y col. (1976) y Sobrino-Figueroa y col. (2007) se llevaron a cabo a 20 °C y salinidad de 25 y 35 0/00, respectivamente, de manera similar al hábitat natural de las vieiras. Las condiciones ambientales como temperatura y

salinidad influyen significativamente en la letalidad y efecto de la mayoría de los tóxicos, por lo que, las diferencias entre las CL₅₀ podrían estar explicadas por dichos factores.

5.1.2. Indicadores de estrés oxidativo

Las ER no presentaron diferencias significativas entre los organismos tratados y los controles en ninguno de los tres tejidos (**Fig. 30 a**). La actividad de CAT sí mostró diferencias significativas respecto al control en los tres tejidos. En la branquia fue significativamente menor en los organismos tratados, observándose un patrón de disminución a medida que aumentaba la concentración desde los 50 µg/L. Si bien en la concentración más baja ensayada no hubo respuesta significativa, dicha actividad fue 28 % menor a la del control (**Fig. 30 b**). Para las concentraciones más altas ensayadas, la disminución fue de 45, 70, 72 y 81 %. En la glándula digestiva solo hubo un aumento significativo de 80 % en la concentración de 150 µg Cd/L, mientras que el músculo no presentó diferencias significativas en ningún caso. La actividad de GST no mostró diferencias significativas respecto al control en la branquia ni en la glándula digestiva, pero sí un aumento significativo en el músculo en todas las concentraciones ensayadas (**Fig. 30 c**). Estos resultados demuestran que, si bien no hubo respuestas significativas en los niveles de ER frente a la exposición de Cd, la actividad enzimática estuvo afectada de diferente manera en cada tejido. Las MT fueron los biomarcadores con mayor respuesta ante la presencia del contaminante. En la branquia y en el músculo se observaron aumentos significativos en todas las concentraciones, mientras que en la glándula digestiva se observaron a partir de los 50 µg Cd/L (**Fig. 30 d**).

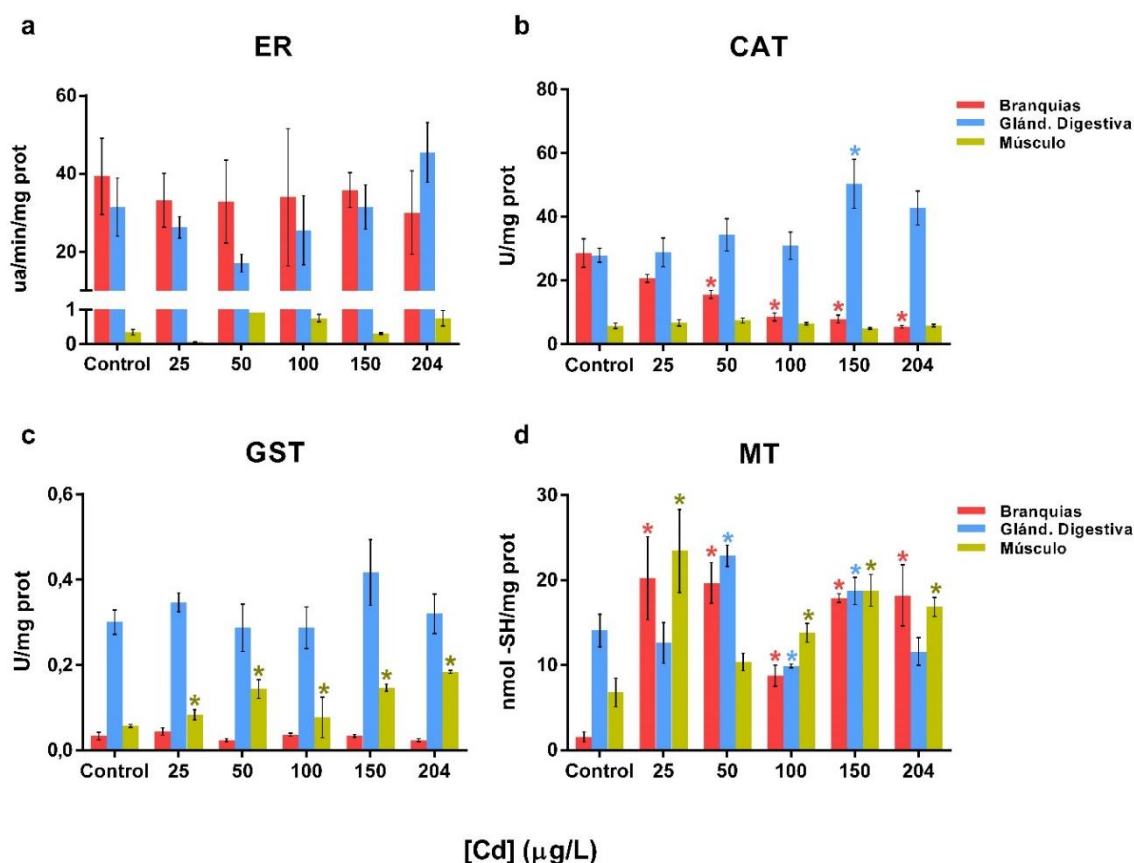


Fig. 30. ER (a), actividad de CAT (b) y GST (c) y contenido de MT (d) en branquia, glándula digestiva y músculo en organismos de *A. tehuelchus*, expuestos durante 96 h a diferentes concentraciones de Cd.

Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tejido (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$).

La peroxidación lipídica fue analizada a través del contenido de TBARS y de α -T (**Fig. 31**). Solo se observaron aumentos significativos en los niveles de TBARS en branquias expuestas a concentraciones mayores a 100 $\mu\text{g Cd/L}$, (**Fig. 31 a**). De manera similar, los niveles de α -T en la branquia presentaron disminuciones significativas en exposiciones de 50 y 150 $\mu\text{g Cd/L}$ y fueron no detectables en exposiciones de 100 y 204 $\mu\text{g Cd/L}$, sugiriendo un probable consumo total del antioxidante. En la concentración de 100 $\mu\text{g Cd/L}$, la glándula digestiva mostró un aumento significativo de 100 % respecto al control y el músculo una disminución de 52 % (**Fig. 31 b**). Considerando que los niveles más altos de TBARS se presentaron en la branquia, es esperable que el consumo de α -T también sea mayor en ese tejido, dada su habilidad para atrapar radicales libres.

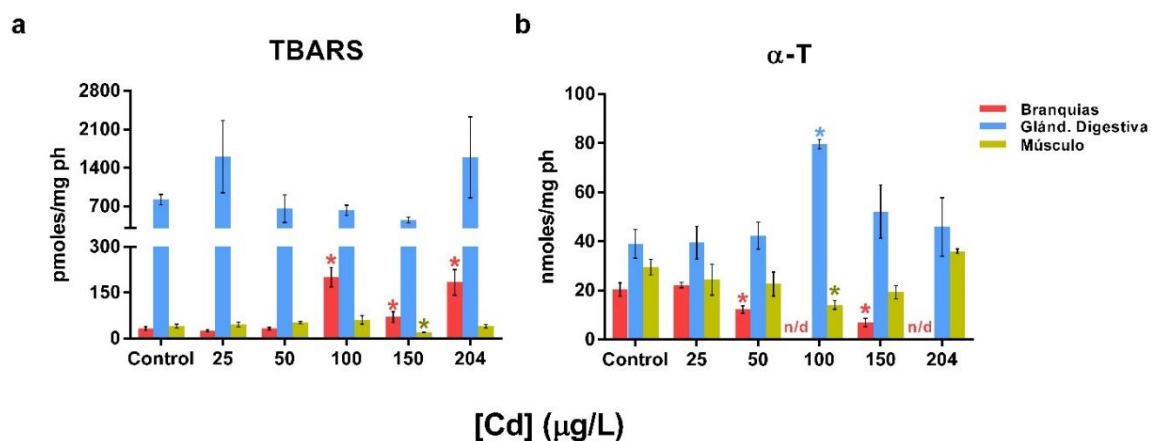


Fig. 31. Niveles de TBARS y α -T en branquia, glándula digestiva y músculo en organismos de *A. tehuelchus*, expuestos durante 96 h a diferentes concentraciones de Cd. Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tejido (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$). n/d = no determinado.

El índice TBARS/ α -T, interpretado como la relación entre el daño a lípidos y la defensa antioxidante en el medio lipídico, mostró en la branquia un aumento significativo respecto al control en la exposición de 150 $\mu\text{g Cd/L}$ (**Fig. 32**). Si bien no es posible calcular este índice para 100 y 204 $\mu\text{g Cd/L}$ por poseer valores no detectables de α -T, se puede esperar que dichos valores sean altos implicando un alto deterioro oxidativo. En la glándula digestiva no se observaron diferencias significativas entre animales expuestos y controles. En el músculo expuesto a 100 $\mu\text{g Cd/L}$ se determinó un aumento significativo respecto al control. Realizando un análisis de los componentes del índice se puede determinar que el aumento de este valor respecto al control se debe exclusivamente al consumo significativo de α -T que podría estar manteniendo los niveles de TBARS similares a los del control, y de esta manera actuando satisfactoriamente contra los posibles daños provocados por el Cd.

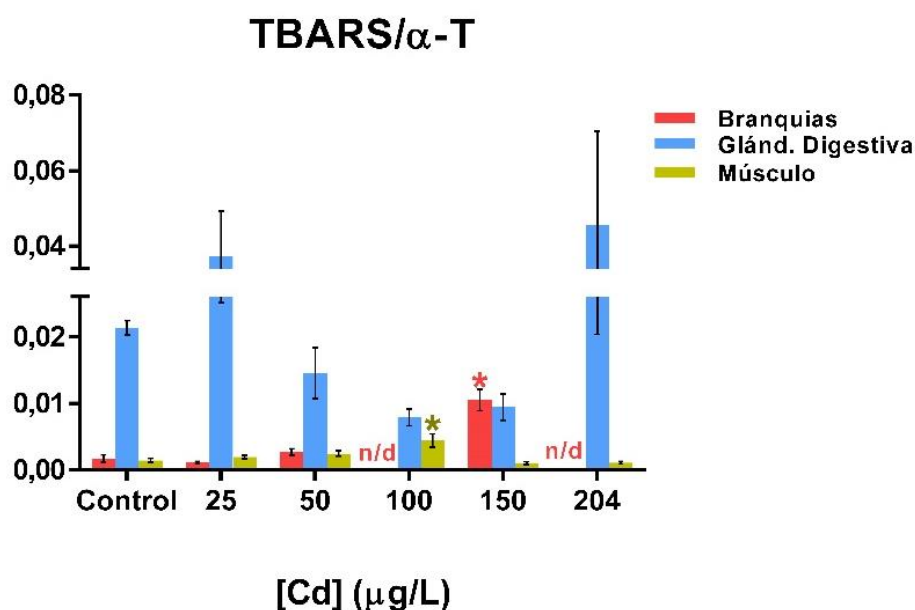


Fig. 32. Índice de TBARS/α-T en branquia, glándula digestiva y músculo en organismos de *A. tehuelchus*, expuestos durante 96 h a diferentes concentraciones de Cd.

Los resultados se expresan como media ± ES (n=3). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tejido (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$). n/d = no determinado.

5.1.3. IBR en experimentos de CL₅₀ Cd

A través del modelo de árboles de regresión reforzado (BRT) se seleccionaron los siguientes biomarcadores para el cálculo del IBR: CAT y MT en la branquia y, MT y α-T en glándula digestiva y músculo. Los valores obtenidos se presentan en la **Tabla 17** y en la **Fig. 33** están representados como gráficos de estrella, donde el área en gris integra los valores para cada concentración ensayada. Se observaron diferencias significativas entre todas las concentraciones de exposición respecto al control. También hubo diferencias significativas entre los tratamientos demostrando un fuerte efecto en la respuesta de los biomarcadores ante un aumento de Cd en el agua. El mayor valor registrado fue en la concentración de 150 µg Cd/L. Esta tendencia coincide con la obtenida en la experiencia de CL₅₀ con As, donde el mayor valor no se registró en las concentraciones más altas ensayadas. Es posible que existan mecanismos de defensa al estrés que estén siendo saturados o que alcancen un límite de respuesta a altas concentraciones.

Tabla 17. IBR a diferentes concentraciones de exposición de Cd en *A. tehuelchus*. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA – Test de Tukey, $p < 0,05$). DE: desvío estándar.

Índice IBR				
	Media	DE	Min	Max
Control	0,12 ^a	0,15	0,00	0,31
25 µg Cd/L	4,33 ^b	0,89	2,63	6,11
50 µg Cd/L	5,46 ^c	0,72	4,18	6,87
100 µg Cd/L	6,27 ^d	0,94	4,57	8,26
150 µg Cd/L	9,14 ^e	0,12	8,94	9,36
204 µg Cd/L	3,44 ^f	0,99	1,39	5,02

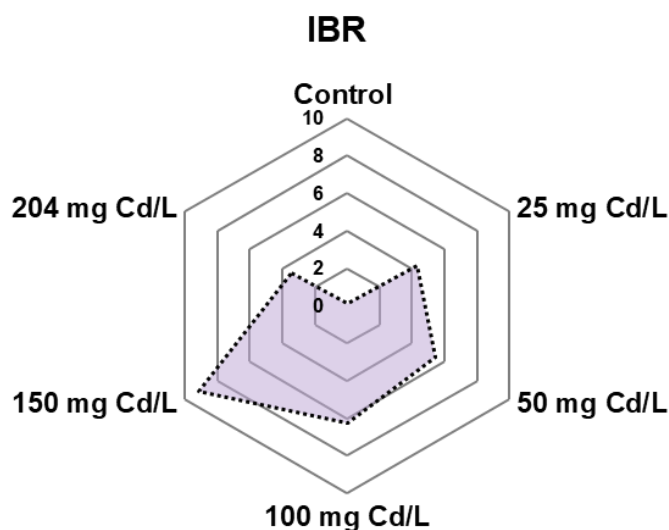


Fig. 33. IBR a diferentes concentraciones de exposición de Cd.

5.2. ENSAYOS SUBLETALES

5.2.1. Indicadores de estrés oxidativo

En los ensayos subletales, los organismos fueron expuestos a concentraciones de 2, 5 y 12 µg Cd/L durante 7 y 14 días. Los resultados de los biomarcadores se presentan por tejido en función de la concentración y del tiempo de exposición (**Fig. 34** - **Fig. 39**). Además, en la **Tabla 18** se muestran los resultados del análisis de ANOVA dos factores para evaluar el efecto de la concentración del Cd y del tiempo de exposición en los biomarcadores, así como la posible interacción entre ambos factores para cada tejido de *A. tehuelchus*. En función de dichos resultados, se realizaron los contrastes de Dunnett

que permiten establecer diferencias significativas entre los tratamientos de exposición respecto al control.

Tabla 18. ANOVA dos factores: efecto de la concentración y tiempo de exposición de As en biomarcadores en *A. tehuelchus*.

		Factores/interacción		
		[Cd]	T	[Cd] x T
Branquias	ER	F(3,24) = 2,01 p = 0,154	F(2,24) = 1,69 p = 0,212	F(6,24) = 6,28 p = 0,005
	CAT	F(3,24) = 5,34 p = 0,010	F(2,24) = 2,05 p = 0,171	F(6,24) = 9,61 p = 0,001
	GST	F(3,24) = 17,32 p < 0,00001	F(2,24) = 1,35 p = 0,262	F(6,24) = 2,11 p = 0,139
	MT	F(3,24) = 1551,30 p < 0,00001	F(2,24) = 1,01 p = 0,329	F(6,24) = 0,58 p = 0,638
	TBARS	F(3,24) = 0,95 p = 0,440	F(2,24) = 0,00 p = 0,969	F(6,24) = 0,86 p = 0,481
	α -T	F(3,24) = 13,238 p = 0,0001	F(2,24) = 1,671 p = 0,215	F(6,24) = 8,51 p = 0,0013
	TBARS/ α -T	F(3,24) = 32,89 p < 0,00001	F(2,24) = 0,00 p = 0,993	F(6,24) = 2,15 p = 0,134
Glándula digestiva	ER	F(3,24) = 11,91 p = 0,000056	F(2,24) = 45,50 p < 0,00001	F(6,24) = 5,60 p = 0,00095
	CAT	F(3,24) = 32,62 p < 0,00001	F(2,24) = 131,65 p < 0,00001	F(6,24) = 8,97 p = 0,00003
	GST	F(3,24) = 8,72 p = 0,0004	F(2,24) = 6,67 p = 0,0193	F(6,24) = 2,39 p = 0,0590
	MT	F(3,24) = 848,53 p < 0,00001	F(2,24) = 1927,70 p < 0,00001	F(6,24) = 212,74 p < 0,00001
	TBARS	F(3,24) = 0,47 p = 0,706	F(2,24) = 7,60 p = 0,014	F(6,24) = 0,90 p = 0,465
	α -T	F(3,24) = 6,05 p = 0,0032	F(2,24) = 0,50 p = 0,60	F(6,24) = 3,77 p = 0,0086
	TBARS/ α -T	F(3,24) = 2,52 p = 0,094	F(2,24) = 4,64 p = 0,0468	F(6,24) = 1,72 p = 0,2037
Músculo	ER	F(3,24) = 1,41 p = 0,263	F(2,24) = 9,39 p = 0,00097	F(6,24) = 0,89 p = 0,5171
	CAT	F(3,24) = 16,70 p = 0,00002	F(2,24) = 9,73 p = 0,00080	F(6,24) = 10,61 p < 0,00001
	GST	F(3,24) = 3,22 p = 0,04	F(2,24) = 0,76 p = 0,47	F(6,24) = 2,13 p = 0,08
	MT	F(3,24) = 128,38 p < 0,00001	F(2,24) = 288,25 p < 0,00001	F(6,24) = 32,78 p < 0,00001
	TBARS	F(3,24) = 13,52 p = 0,00011	F(2,24) = 1,81 p = 0,197	F(6,24) = 1,21 p = 0,338
	α -T	F(3,24) = 0,29 p = 0,82	F(2,24) = 2,80 p = 0,08	F(6,24) = 0,20 p = 0,97
	TBARS/ α -T	F(3,24) = 11,92 p = 0,00024	F(2,24) = 0,001 p = 0,979	F(6,24) = 4,37 p = 0,0199

Las diferencias significativas se muestran en negrita.

Los niveles de ER mostraron distintos patrones en función del tejido analizado (**Fig. 34**). En la branquia solo se registraron disminuciones significativas respecto al control en función de la exposición a los 14 días para todas las concentraciones ensayadas, mientras que en la glándula digestiva se presentaron aumentos significativos en las exposiciones de 5 $\mu\text{g Cd/L}$ para ambos tiempos y 12 $\mu\text{g Cd/L}$ solo para los 14 días de exposición. Por el contrario, el músculo no presentó diferencias significativas para ninguna concentración ni tiempo de exposición. De manera similar a los resultados obtenidos con As, la branquia fue el tejido más sensible y el músculo fue el de menor respuesta al tóxico.

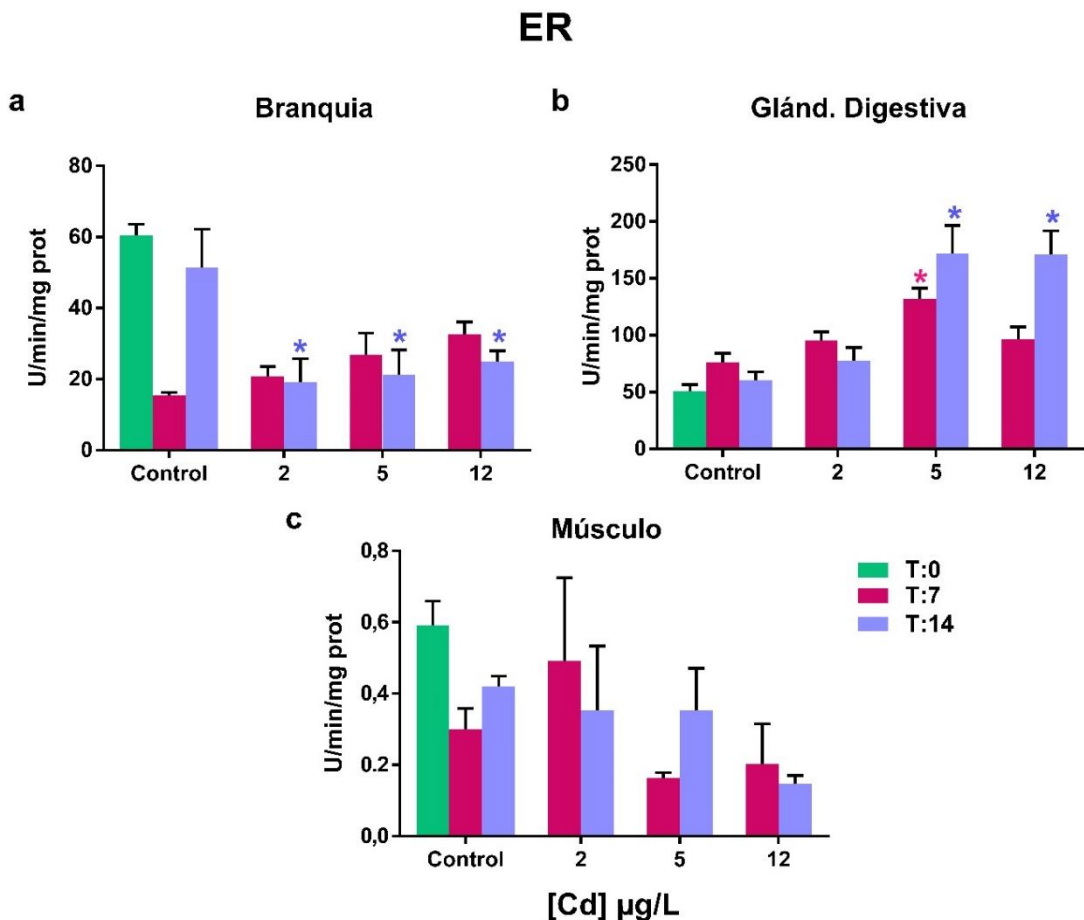


Fig. 34. ER en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tchuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de Cd. Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tiempo (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$).

La actividad de CAT también varió en cada tejido (**Fig. 35**). La branquia solo mostró un aumento de actividad en la menor concentración ensayada a los 14 días de exposición y en los 5 $\mu\text{g Cd/L}$ a los 7 días de exposición (**Fig. 35 a**). La glándula digestiva fue el tejido que presentó aumentos significativos en todas las concentraciones ensayadas y

tiempos de exposición (**Fig. 35 b**). En el músculo, la actividad de CAT a los 7 días de exposición aumentó significativamente en la menor concentración ensayada, mientras que en 5 y 7 $\mu\text{g Cd/L}$ disminuyó significativamente (**Fig. 35 c**).

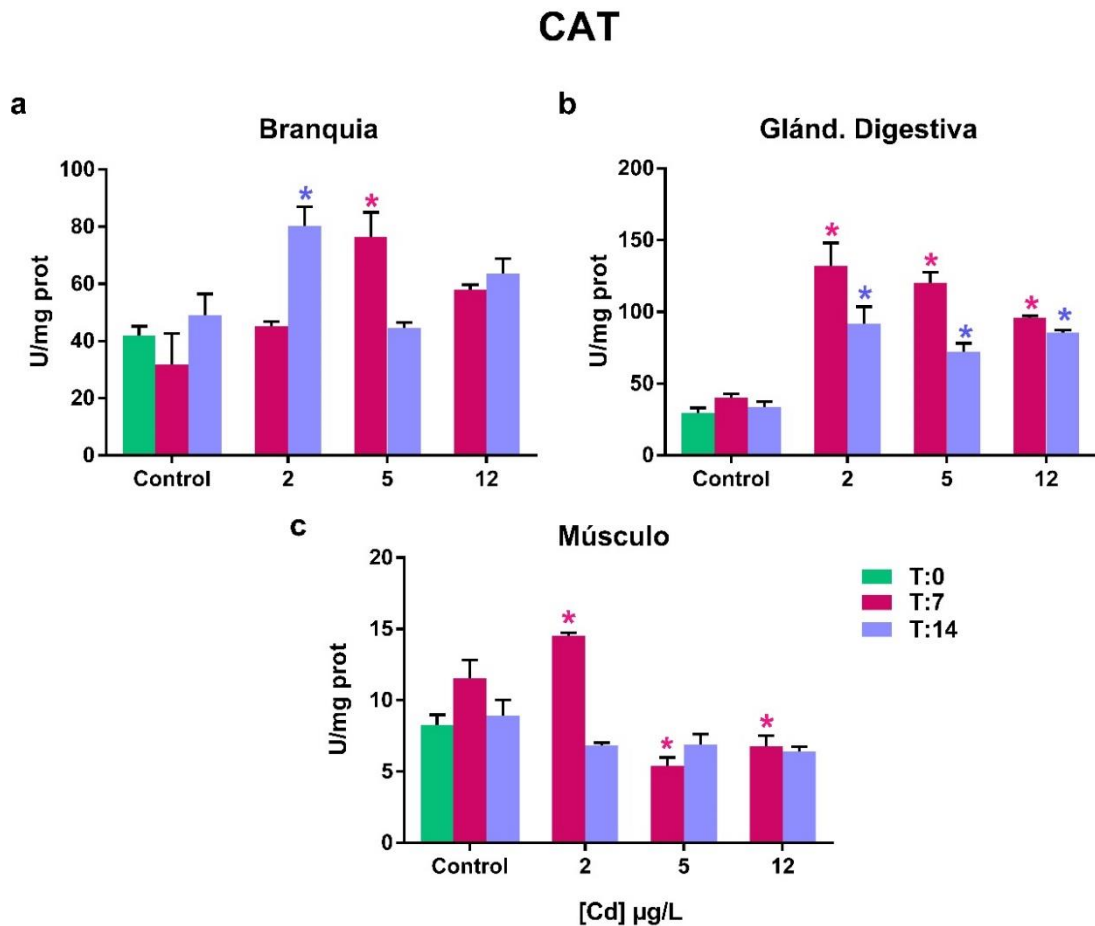


Fig. 35. Actividad de CAT en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de Cd.

Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tiempo (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$).

La actividad de GST presentó diferencias significativas en los tres tejidos analizados. En la branquia fue significativamente menor en todas las concentraciones ensayadas y tiempos de exposición, a excepción de la concentración de 2 $\mu\text{g Cd/L}$ a los 14 días de exposición (**Fig. 36 a**). De manera similar a CAT, la actividad de GST en la glándula digestiva mostró un incremento significativo en todas las concentraciones y tiempos de exposición (**Fig. 36 b**). Finalmente, el músculo solo presentó una disminución significativa a los 7 días de exposición para las concentraciones de 2 y 5 $\mu\text{g Cd/L}$ (**Fig. 36 c**).

Incrementos en las actividades de CAT y GST ocurren frecuentemente a niveles bajos de exposición, mostrando un aumento compensatorio para superar el estrés oxidativo. Sin embargo, con el aumento de la presión oxidativa, la inducción inicial puede ser seguida de un agotamiento de las enzimas, que se encontrarán saturadas (Fernández Galindo, 2012).

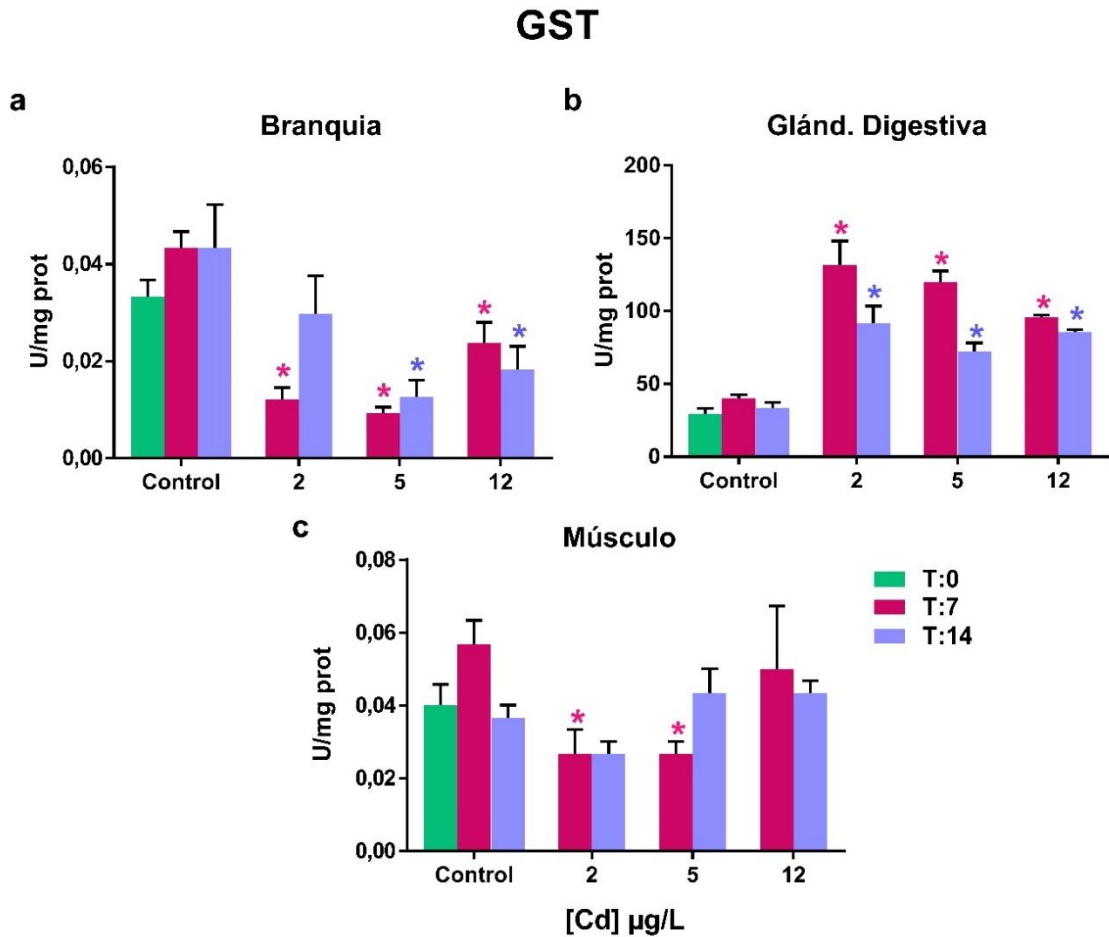


Fig. 36. Actividad de GST en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de Cd.

Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tiempo (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$).

Los niveles de MT se vieron significativamente aumentados en similar proporción en los tres tejidos para todas las concentraciones y tiempos de exposición (**Fig. 37**). Esto sugiere que la máxima expresión de estas proteínas ya se había alcanzado para la menor concentración ensayada, manteniéndose constante en todo el rango de exposiciones.

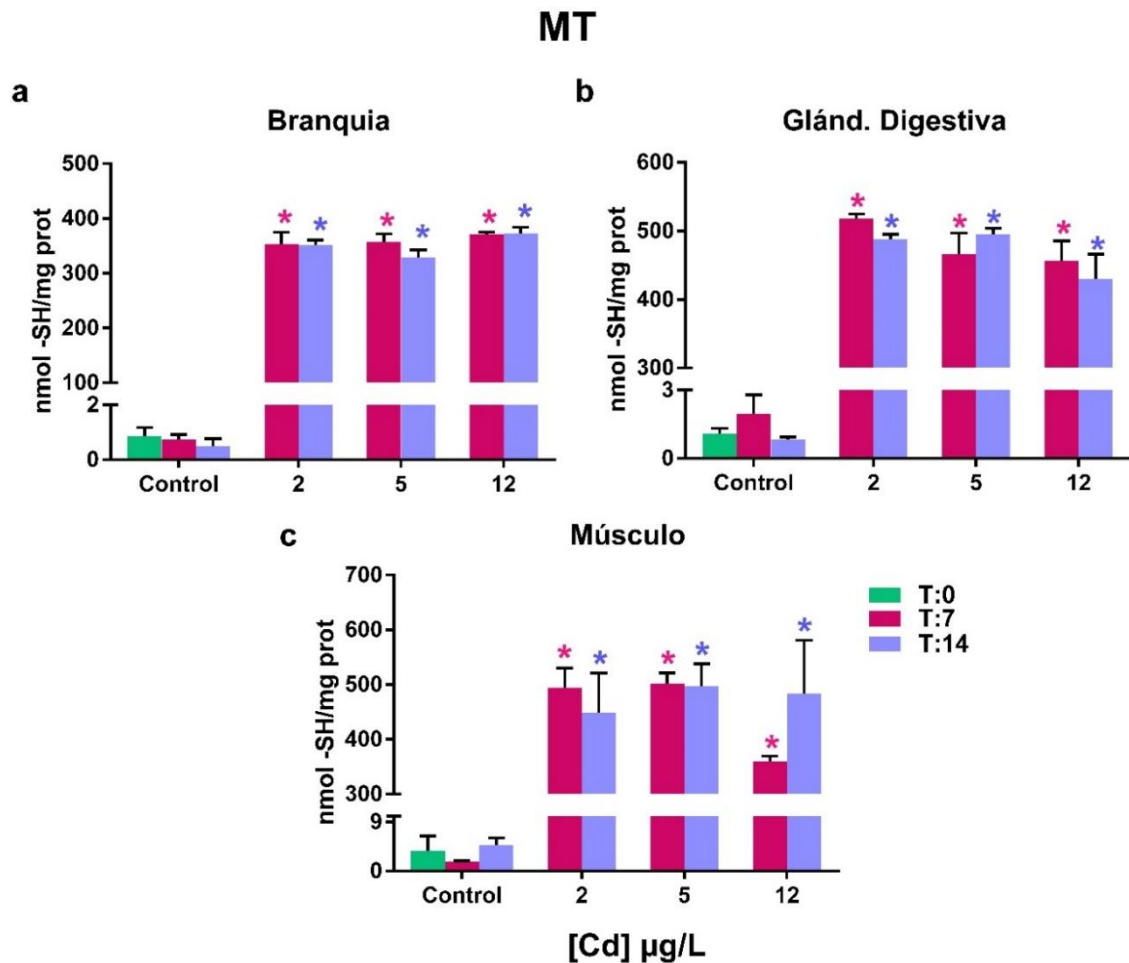


Fig. 37. Contenido de MT en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de Cd.

Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tiempo (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$).

Los niveles de TBARS se mantuvieron sin cambios en la branquia y en la glándula digestiva (**Fig. 38 a y b**), mientras que en el músculo, se observaron disminuciones significativas en todas las concentraciones y tiempos de exposición (**Fig. 38 c**). Además, respecto al tiempo de exposición no habría un efecto diferente entre los 7 y 14 días (excepto para la concentración de 12 µg Cd/L).

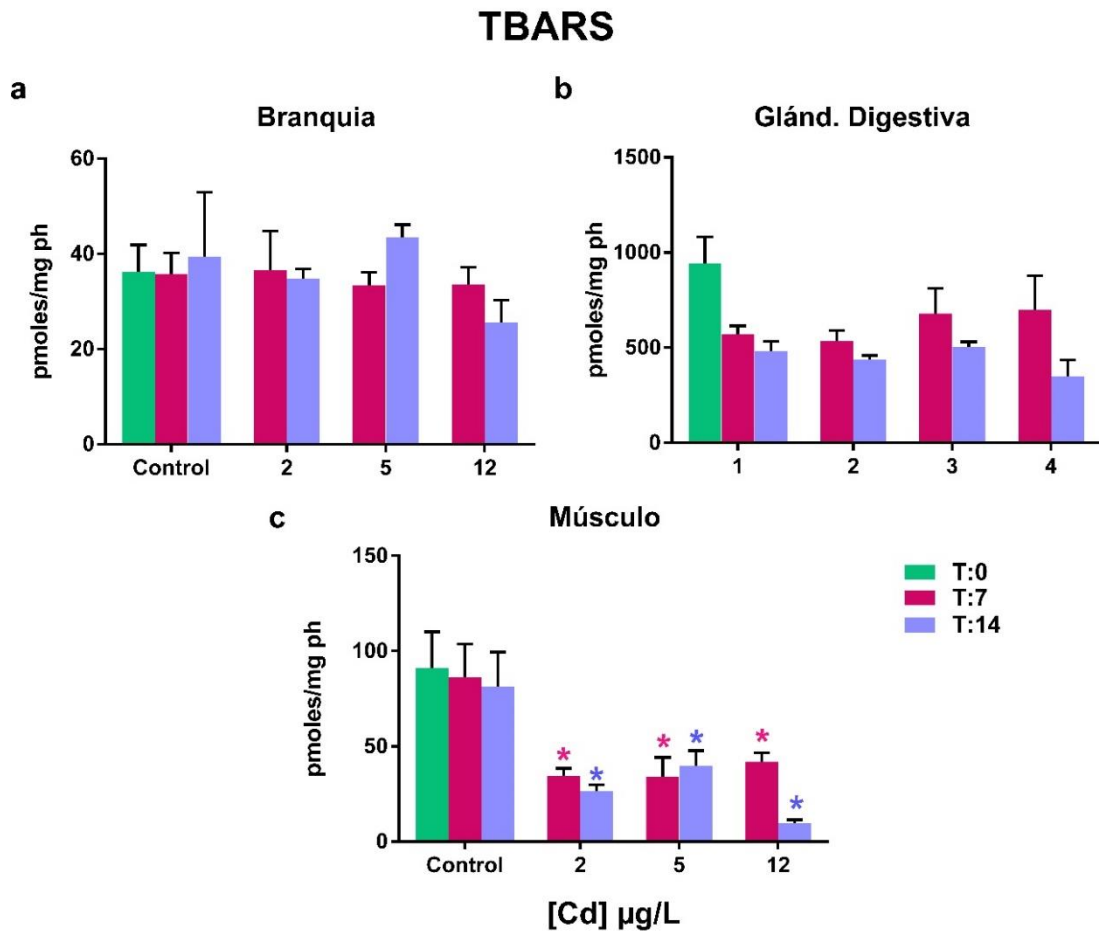


Fig. 38. TBARS en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de Cd. Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tiempo (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$).

El contenido de α -T en la branquia presentó incrementos significativos a los 7 días de exposición en las concentraciones de 2 y 5 $\mu\text{g Cd/L}$ y a los 14 días sólo en 5 $\mu\text{g Cd/L}$ (**Fig. 39 a**). α -T en la glándula digestiva mostró un único aumento significativo en la concentración más baja ensayada a los 14 días de exposición (**Fig. 39 b**), mientras que el músculo no presentó diferencias en ninguno de los casos estudiados (**Fig. 39 c**).

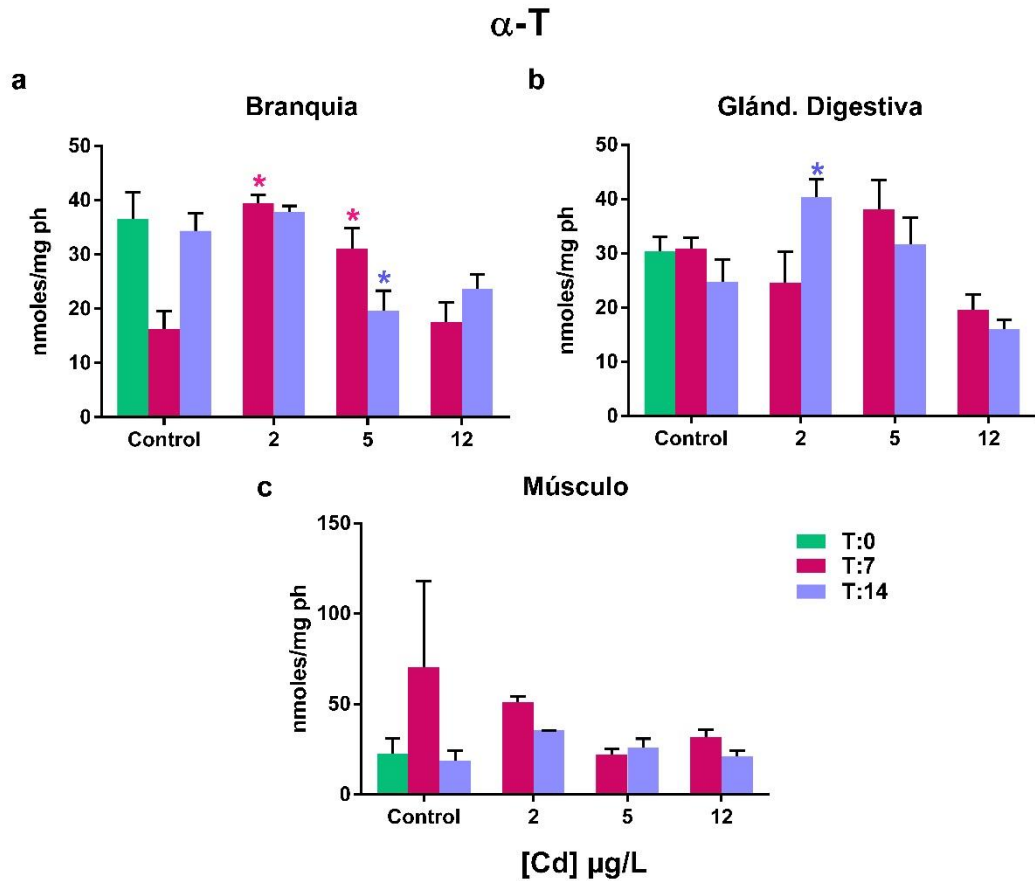


Fig. 39. Contenido α -T en branquia (a), glándula digestiva (b) y músculo (c) de *A. tehuelchus* al inicio del experimento y a los 7 y 14 días de exposición a distintas concentraciones de Cd. Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$). Los asteriscos representan diferencias significativas con el grupo control para cada tiempo (ANOVA - Test de Dunnett; $p < 0,05$).

En la **Tabla 19** se muestran los valores de la relación TBARS/ α -T. La branquia presentó diferencias significativas en todas las concentraciones y tiempos de exposición, mientras que la glándula digestiva no mostró diferencias en ningún caso estudiado. El músculo mostró disminuciones significativas a los 14 días de exposición para todas las concentraciones ensayadas.

Tabla 19. Relación TBARS/ α -T en branquia, glándula digestiva y músculo de *A. tehuelchus* para los cuatro tratamientos a 0, 7 y 14 días de experimentación. Los resultados se expresan como media \pm ES ($n=3$).

	Tratamiento	Tiempo	Branquia	Glándula digestiva	Músculo
TBARS/ α -T (10^{-3})	Control	0 d	0,03 \pm 0,01	31,79 \pm 6,33	5,91 \pm 2,39
		7 d	0,02 \pm 0,01	18,68 \pm 2,13	2,49 \pm 1,19
		14 d	0,01 \pm 0,00	20,02 \pm 1,86	4,70 \pm 0,72
	2 μ g/L	7 d	10,80 \pm 2,61*	23,27 \pm 3,45	0,68 \pm 0,08
		14 d	10,12 \pm 0,50*	10,97 \pm 1,27	0,75 \pm 0,10*
	5 μ g/L	7 d	10,83 \pm 0,95*	18,42 \pm 3,80	1,48 \pm 0,23
		14 d	7,63 \pm 0,64*	16,72 \pm 2,75	1,71 \pm 0,49*
	12 μ g/L	7 d	11,40 \pm 1,43*	38,09 \pm 10,97	1,39 \pm 0,31
		14 d	15,31 \pm 2,40*	21,96 \pm 5,90	0,46 \pm 0,06*

Los asteriscos denotan diferencias significativas (ANOVA – Test de Dunnet; $p < 0,05$) entre cada tratamiento respecto al control para cada tiempo de exposición.

5.2.2. IBR en experimentos subletales con Cd

A través del modelo de árboles de regresión reforzado (BRT) se seleccionaron los siguientes biomarcadores para el cálculo del IBR: CAT, MT y α -T en branquia, GST y α -T en glándula digestiva y CAT en músculo para 7 días de exposición; MT y α -T en branquia, ER, GST, TBARS y α -T en glándula digestiva y GST en músculo para los 14 días. Los valores obtenidos de IBR a 7 y 14 días de exposición se presentan en la **Fig. 40** y **Tabla 20** respectivamente. En los gráficos de estrella, el área en gris integra los valores para cada concentración ensayada.

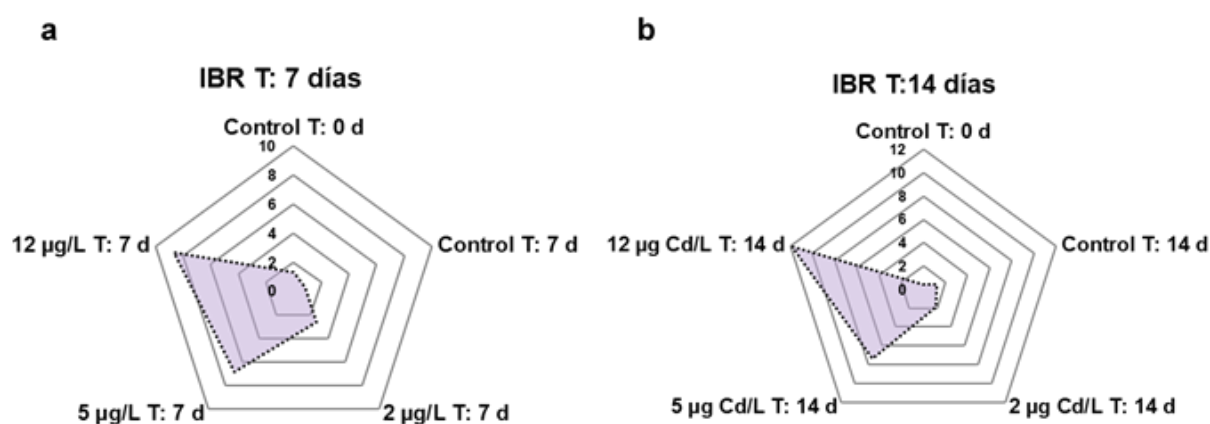


Fig. 40. IBR a diferentes concentraciones de exposición de Cd a los 7 (a) y 14 (b) días en *A. tehuelchus*.

Se observaron diferencias significativas de los valores de IBR entre todas las concentraciones de exposición (**Tabla 20**). Tanto a los 7 como a los 14 días de exposición, se registraron los mayores valores de IBR en la concentración más alta ensayada.

Tabla 20. IBR a diferentes concentraciones de Cd a los 7 y 14 días de exposición en *A. tehuelchus*.

	Índice IBR							
	T: 7 días				T: 14 días			
	Media	DE	Min	Max	Media	DE	Min	Max
Control (T:0 d)	1,28 ^a	0,25	0,80	1,77	0,39 ^a	0,37	0,00	0,90
Control (T:7/14 d)	0,83 ^b	0,48	0,00	1,71	1,23 ^b	0,60	0,41	2,25
2 µg Cd/L	2,66 ^c	0,79	1,14	3,97	1,92 ^c	0,71	0,59	3,20
5 µg Cd/L	6,87 ^d	0,84	5,55	8,29	7,35 ^d	0,45	6,51	8,20
12 µg Cd/L	8,65 ^e	0,24	8,22	9,07	11,86 ^e	0,24	11,40	12,28

Las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA - Test de Tukey; $p < 0,05$). DE: desvío estándar.

5.3. CORRELACIONES ENTRE Cd, BIOMARCADORES E IBR

5.3.1. Niveles de exposición de Cd, biomarcadores de estrés oxidativo e IBR

Los biomarcadores que se correspondieron significativamente con los niveles de exposición de Cd fueron CAT, GST, TBARS y α -T en al menos un tejido durante las 96 h de exposición (**Tabla 20**). La branquia fue el tejido con mayor cantidad de correlaciones significativas, las cuales fueron negativas con la actividad de CAT y los niveles de α -T y positiva con los niveles de TBARS. La glándula digestiva solo mostró una correlación significativa y positiva con CAT y el músculo con GST. Cabe destacar además que la branquia mostró una fuerte correlación positiva significativa con el índice de TBARS/ α -T ($R^2 = 0,918$, $p < 0,0001$).

Tabla 21. Coeficiente de correlación entre los niveles de exposición de Cd y los biomarcadores analizados a las 96 h de exposición.

[Cd]	Tiempo	Biomarcador						
		R ²	ER	CAT	GST	MT	TBARS	α-T
Branquia	96 h	R ²	-0,353	-0,852	-0,196	0,424	0,747	-0,830
		p	0,913	<0,0001	0,541	0,170	0,005	0,001
Glándula digestiva	96 h	R ²	0,458	0,609	0,198	-0,134	0,0650	0,251
		p	0,056	0,007	0,432	0,595	0,798	0,315
Músculo	96 h	R ²	0,319	-0,300	0,785	0,292	-0,265	0,136
		p	0,196	0,226	<0,0001	0,240	0,288	0,591

Los números en **negrita** indican correlaciones significativas a $p < 0,05$.

En la **Tabla 22** se presentan las correlaciones entre los niveles de exposición de Cd y la respuesta de los biomarcadores para ambos tiempos de exposición. Todos los biomarcadores analizados, a excepción de GST, presentaron correlaciones significativas en al menos un tejido y tiempo analizado. De manera similar a los ensayos agudos de 96 h de exposición, en los ensayos crónicos, la branquia fue el tejido con mayor número de correlaciones significativas, las cuales fueron positivas para ER a los (7 días de exposición) y MT (7 y 14 d) y negativa para el α-T (14 d). La glándula digestiva sólo presentó correlación positiva para ER a los 14 días de exposición. El músculo exhibió correlaciones significativas negativas para ER (7 d) y TBARS (14 d) y positiva para MT (14 d).

Respecto a las correlaciones entre los niveles de exposición y el IBR, en los experimentos de letalidad no hubo correlaciones significativas mientras que en los subletales hubo correlaciones positivas significativas en 7 y 14 días de exposición ($R^2 = 0,965$ $p < 0,0001$ y $R^2 = 0,9570$; $p < 0,0001$, respectivamente).

Respecto a las correlaciones entre los niveles de exposición y el IBR, en los experimentos de letalidad no hubo correlaciones significativas ($R^2 = 0,512$; $p = 0,170$) mientras que en los subletales hubo correlaciones positivas significativas en 7 y 14 días de exposición ($R^2 = 0,965$ $p < 0,0001$ y $R^2 = 0,9570$; $p < 0,0001$, respectivamente).

Tabla 22. Coeficiente de correlación entre los niveles de exposición de Cd y los biomarcadores analizados a los 7 y 14 días de exposición.

[Cd]	Tiempo		Biomarcador					
			ER	CAT	GST	MT	TBARS	α -T
Branquia	7 d	R ²	0,738	0,469	-0,261	0,632	-0,142	-0,260
		p	0,006	0,124	0,413	0,027	0,659	0,410
	14 d	R ²	-0,367	0,064	-0,571	0,650	-0,383	-0,590
		p	0,241	0,843	0,052	0,022	0,219	0,043
Glándula digestiva	7 d	R ²	0,248	0,249	0,095	0,520	0,323	-0,376
		p	0,437	0,434	0,769	0,083	0,305	0,228
	14 d	R ²	0,754	0,507	0,346	0,503	-0,482	-0,555
		p	0,005	0,093	0,270	0,096	0,112	0,061
Músculo	7 d	R ²	-0,308	-0,640	0,060	0,367	-0,404	-0,339
		p	0,329	0,025	0,853	0,240	0,192	0,281
	14 d	R ²	-0,5368	-0,521	0,447	0,583	-0,694	-0,176
		p	0,072	0,082	0,145	0,046	0,012	0,584

Los números en negrita indican correlaciones significativas a $p < 0,05$.

5.4. Ensayos agudos vs. crónicos

Como se mencionó en el capítulo 4 (ver sección 4.4), los resultados entre los ensayos agudos y crónicos están estrechamente asociados a la historia de exposición de los organismos en el ambiente en el que viven. En el GSJ los niveles de Cd si bien son naturales, les aportarían diferentes estrategias o capacidades de enfrentar un posible estrés en caso de un aumento de la exposición al Cd.

En términos muy generales, y con variaciones entre los tejidos analizados, las respuestas de los biomarcadores en los ensayos agudos y crónicos de Cd mostraron el mismo perfil de respuesta (sin variaciones en ER, TBARS y α -T y aumento de MT). Las actividades de CAT y GST fueron las únicas excepciones, con respuestas diversas en los ensayos subletales para los tres tejidos. Los organismos sometidos a exposiciones de Cd agudas y crónicas tendrían una alta capacidad de regular los efectos del Cd y, además, dicha capacidad podría sostenerse en el tiempo, a diferencia de los efectos de la exposición al As que mostraron efectos negativos en exposiciones de mayor duración.

Como se mencionó en el capítulo 4 (ver sección 4.4), los resultados entre los ensayos agudos y crónicos están estrechamente asociados a la historia de exposición de los

organismos en el ambiente en el que viven. En el GSJ los niveles de Cd si bien son naturales, les aportarían diferentes estrategias o capacidades de enfrentar un posible estrés en caso de un aumento de la exposición al Cd.

En términos muy generales, y con variaciones entre los tejidos analizados, las respuestas de los biomarcadores en los ensayos agudos y crónicos de Cd mostraron el mismo perfil de respuesta ante la exposición al mismo (sin variaciones en ER, TBARS y α -T y aumento de MT). La actividad de CAT y GST fue la única excepción, con respuestas diversas en los ensayos subletales para los tres tejidos. Los organismos sometidos a exposiciones de Cd agudas y crónicas tendrían una alta capacidad de regular los efectos del Cd y, además, dicha capacidad podría sostenerse en el tiempo, a diferencia de los efectos de la exposición al As que mostraron efectos negativos en exposiciones de mayor duración.

5.5. CONSIDERACIONES FINALES: EFECTO DEL Cd EN A. TEHUELCHUS

La baja CL₅₀ para Cd demuestra que esta especie es mucho más sensible a dicho tóxico respecto a otros bivalvos similares. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las condiciones ambientales como temperatura y salinidad son parámetros que influyen significativamente en la letalidad y efecto de la mayoría de los tóxicos (Fernández Galindo y col., 2010). Por lo tanto, las diferencias obtenidas respecto a otras especies pueden deberse no solo a la historia de vida de los organismos expuestos naturalmente a altas concentraciones de Cd en el medio en el que viven, sino también a diferencias en las condiciones de hábitat. En el ambiente, los metales suelen estar presentes en forma de mezclas y el efecto de esas mezclas o combinaciones aún no está completamente comprendida. Particularmente, se ha reportado el efecto modulador del Cd en la toxicidad de una mezcla de Cd, Cr y Pb en juveniles de *Argopecten ventricosus* (Sobrino-Figueroa y col., 2007).

Está ampliamente demostrado que los bivalvos presentan una alta capacidad de acumulación de este metal en las branquias y la glándula digestiva (Macías-Mayorga y col., 2015). A diferencia del As, el proceso de acumulación no tiene lugar de manera lineal, y la concentración de Cd tiende a un estado de saturación que depende principalmente del tiempo de exposición (Serafim y Bebianno, 2007).

Las tendencias generales del efecto de Cd sobre *A. tehuelchus* se resumen en la **Fig. 41**. Cuando los bivalvos, y en particular las vieiras, son expuestos a contaminación por metales(oides), pueden inducir la síntesis de metalotioneínas (MT), para quelar iones metálicos en solución, como una estrategia para reducir la unión del metal a biomoléculas importantes y el aumento de ER. Las vieiras también pueden activar sus sistemas antioxidantes para eliminar ER, induciendo la actividad de enzimas antioxidantes como CAT y GST y minimizando así el daño oxidativo, como LPO.

Las ER mostraron diferentes resultados en los experimentos agudos y crónicos (**Fig. 41**). En tiempos cortos de exposición y a concentraciones altas, la velocidad de oxidación de la DCFH-DA no presentó diferencias respecto al control, mientras que en las experiencias de mayor tiempo de exposición (14 d) tanto la branquia como la glándula digestiva mostraron disminuciones y aumentos (respectivamente) en función al control. Además, en los ensayos subletales, con mayor tiempo de exposición, hubo una mejor respuesta de los biomarcadores, tanto para los 7 como 14 d. De esta forma, la activación del sistema de defensa estaría respondiendo a las ER inducidas por el Cd.

Dependiendo de los niveles de ER, la capacidad antioxidante puede verse aumentada debido a la inducción de la actividad enzimática, o inactivada a través de un efecto inhibitor. En condiciones similares de estrés oxidativo, las proteínas antioxidantes pueden sufrir ataque directo de ER o por mecanismos oxidativos indirectos (Regoli y Giuliani, 2014). La disminución de la actividad de CAT y GST observada principalmente en las branquias y músculo de ambos ensayos, puede estar relacionada con cierto grado de inhibición a altas concentraciones de Cd. Contrariamente, en la glándula digestiva, la actividad solo fue aumentada en las experiencias subletales, denotando el efecto en dicho tejido a largo plazo.

Tanto en las experiencias letales como subletales, se observó el mismo patrón de respuesta de las MT con un aumento no constante en los tres tejidos. Aunque el proceso de desintoxicación llevado a cabo por la inducción de MT está relacionado con el aumento de la concentración de Cd, este proceso no es lineal y alcanza la fase estacionaria indicando que el proceso está limitado por la concentración interna en el tejido (Macías-Mayorga y col., 2015). A largo plazo, la saturación del mecanismo de desintoxicación realizado por la inducción de MT en respuesta a la alta acumulación de Cd, puede llevar a una condición de estrés oxidativo, como consecuencia del desequilibrio entre la

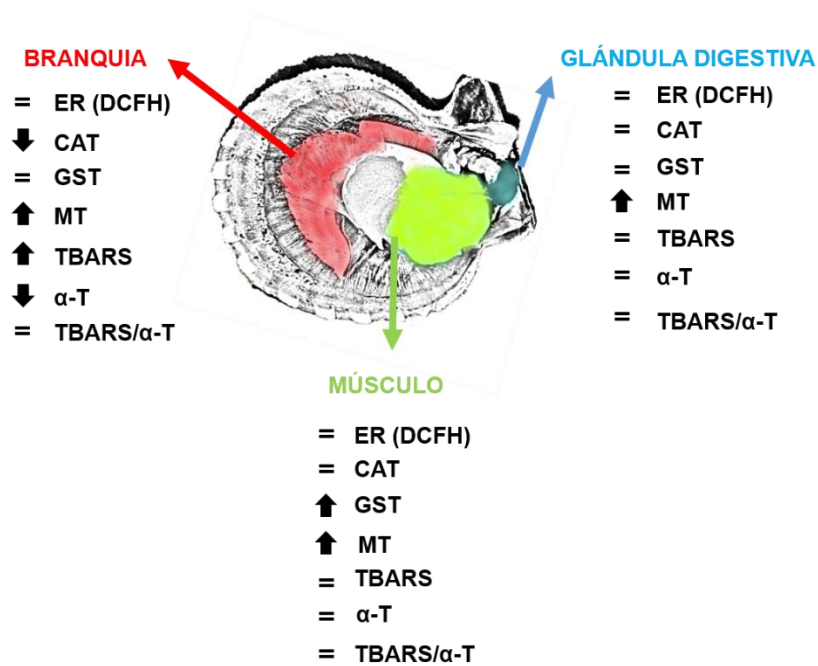
producción y la eliminación de ER conduciendo a la potencial muerte del organismo (Serafim y Bebianno, 2007).

Niveles más altos de TBARS indican mayor daño en los tejidos y niveles similares al control dan un indicio sobre la eficiencia de los sistemas antioxidantes activados o la ausencia de efecto del contaminante en los tejidos. En los ensayos letales solo la branquia presentó un aumento en los niveles de TBARS, mientras que en los ensayos subletales el músculo fue el único tejido que registró una disminución de dichos niveles. Estos resultados son similares a los hallados por Figueira y col. (2012) en experiencias con almejas. En los casos donde no se observó un aumento de los niveles de TBARS, es probable que la inducción de MT o del sistema antioxidante fueron suficientes para evitar la LPO.

En la glándula digestiva y músculo, en ambos ensayos, los niveles de α -T se mantuvieron similares a los del control, mientras que en la branquia se presentaron diferencias en cada ensayo. Solo en los ensayos letales, en este tejido se observó una disminución de los niveles de α -T siendo explicado por su consumo, con el objetivo de mitigar los posibles daños en la célula en presencia de xenobióticos o algún factor de estrés.

a

Ensayo letal



b

Ensayo subletal

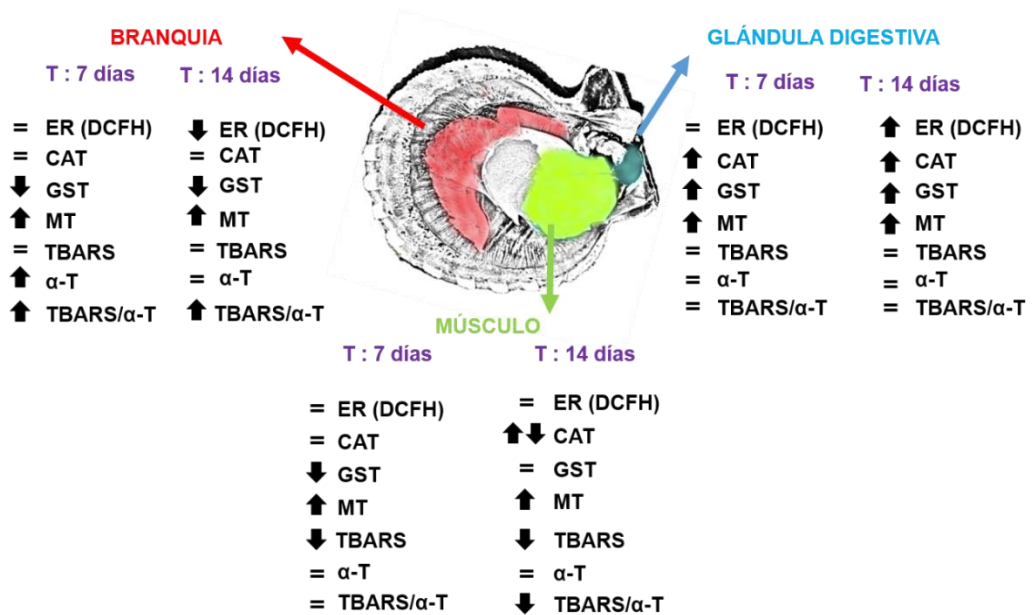


Fig. 41. Tendencia general de los efectos de concentraciones de Cd letales (a) y subletales (b) en branquia, glándula digestiva y músculo de *A. tehuelchus*, expuestos durante 96 h, 7 y 14 d.

Las diferentes respuestas en las branquias respecto a los otros tejidos, estarían relacionadas con su papel fisiológico en la respiración, donde la filtración de grandes volúmenes de agua asegura un muy buen suministro de oxígeno y un primer contacto con el tóxico disuelto en el agua (Regoli, 1998). Considerando esto, es esperable que las branquias posean una mayor activación del sistema de defensa a las 96 h respecto a los otros tejidos analizados. Además, debe tenerse en cuenta que la relación detectada entre la temperatura del agua y las respuestas antioxidantes en las branquias probablemente esté relacionada con el hecho de que su epitelio está en contacto directo con el agua y, por lo tanto, es muy sensible a sus fluctuaciones. De hecho, las branquias son más susceptibles a los cambios en los parámetros ambientales y más propensas al estrés oxidativo que otros tejidos, lo que también implica que los mecanismos antioxidantes deben ser más rápidos y eficientes en este tejido que en otros (Regoli y Principato, 1995).

El análisis IBR aplicado a biomarcadores indica claramente que los tres tejidos muestran una estimulación de la actividad enzimática (principalmente en exposiciones de larga duración) a concentraciones bajas de Cd (a partir de los 2 µg Cd/L). Este contexto indicaría que, incluso a altas concentraciones de exposición al Cd, el sistema de defensa enzimática puede neutralizar el efecto tóxico del metal sin ser inhibido este mecanismo.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los estudios ambientales realizados en los compartimientos abióticos mostraron que las concentraciones en agua de As en San Román y de Cd en ambos sitios, superaron los niveles guía de calidad para la protección de la vida marina según el CCME, tanto en invierno como en verano. Por el contrario, las concentraciones medidas en los sedimentos en ningún caso superaron los niveles guía establecidos por el CCME.

En cuanto a la bioacumulación de ambos elementos por *A. tehuelchus* en el medio natural, los niveles en tejido blando completo se encontraron por debajo de los permitidos por el Código Alimentario Argentino. Considerando los tejidos individuales, las mayores concentraciones se registraron en la glándula digestiva, seguidas por la branquia y el músculo. Aun cuando el CCA fija los límites sobre la base del organismo completo, es importante resaltar que en los tres tejidos para el As y en la glándula digestiva para el Cd, los niveles hallados superaron dichos límites.

Teniendo en cuenta el cociente de riesgo calculado para todo el tejido blando, el consumo de *A. tehuelchus* no implicaría un riesgo para la salud humana. Debe considerarse, sin embargo, que este cociente se calculó utilizando parámetros fijados por la US EPA (U.S. Environmental Protection Agency). Futuros estudios deberían tener en cuenta otros rangos etarios, género y peso, así como grupos de la población regional probablemente expuestos a mayor riesgo debido al mayor consumo del producto, como son los pescadores artesanales, entre otras variables.

En *A. tehuelchus*, las respuestas de los biomarcadores dependen principalmente de la estacionalidad y no de las diferentes condiciones de los sitios San Román y El Riacho. La glándula digestiva mostró mayor inducción de los parámetros de estrés oxidativo como ER, actividades enzimáticas de CAT y GST, y contenido de TBARS y α -T. Se recomienda tener en cuenta dicho efecto a la hora de realizar ensayos toxicológicos, comparación con otras especies y para la extrapolación de los resultados a otros sitios similares.

En base a las CL50 de 96 h, *A. tehuelchus* fue menos sensible al As (7,1 mg As/L) que al Cd (155,8 μ g Cd/L).

Los resultados sugieren una alta capacidad de acumulación de As de la especie *A. tehuelchus*, con niveles similares en los tres tejidos en exposiciones letales y mayores en branquia y glándula digestiva respecto al músculo en exposiciones subletales.

El principal efecto del As a concentraciones cercanas a la letalidad en *A. tehuelchus* fue la generación de estrés oxidativo leve, sin observarse daño en los tejidos, evidenciado en el aumento de la actividad enzimática y de MT y disminución de α -T, mientras que el Cd solo afectó el nivel de MT.

A concentraciones subletales de As, se indujeron la producción de ER, la actividad de CAT y los niveles de MT, mientras que a concentraciones subletales Cd se indujeron las actividades de CAT y GST y las MT.

Dado que las respuestas bioquímicas estudiadas pueden verse afectadas por otros factores ambientales y fisiológicos además de otros contaminantes diferentes a los considerados, se evidencia la importancia de la integración de estos parámetros en los estudios de monitoreo y evaluación de la calidad ambiental marina para la correcta aplicación e interpretación de los biomarcadores.

El uso de una batería de biomarcadores de estrés oxidativo y la integración de los mismos a través del índice IBR permitieron establecer el impacto del As y Cd sobre un importante recurso pesquero como es la vieira tehuelche en el golfo San José desde una perspectiva de múltiples tejidos.

Este estudio representa la primera información integral y esencial en la zona del golfo San José de una especie de bivalvo de interés comercial como es la vieira *A. tehuelchus* para una interpretación adecuada de los datos ecotoxicológicos futuros y los programas de monitoreo ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Abele, D., Puntarulo, S., 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 138, 405–415. doi:10.1016/j.cbpb.2004.05.013
- Alexander, T.C., Han, F.X., Arslan, Z., Tchounwou, P.B., 2019. Toxicity of As in *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) from the Northern Gulf of Mexico at the presence of Zn and its antioxidant defense mechanisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 172, 514–522. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.02.009
- Alvarez, M. del P., Carol, E., 2019. Geochemical occurrence of arsenic, vanadium and fluoride in groundwater of Patagonia, Argentina: Sources and mobilization processes. *J. South Am. Earth Sci.* 89, 1–9. doi:10.1016/j.jsames.2018.10.006
- Alves de Almeida, E., Celso Dias Bainy, A., Paula de Melo Loureiro, A., Regina Martinez, G., Miyamoto, S., Onuki, J., Fujita Barbosa, L., Carrião Machado Garcia, C., Manso Prado, F., Eliza Ronsein, G., Alexandre Sigolo, C., Barbosa Brochini, C., Maria Gracioso Martins, A., Helena Gennari de Medeiros, M., Di Mascio, P., 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 146, 588–600. doi:10.1016/j.cbpa.2006.02.040
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015
- Amoroso, R.O., Parma, A.M., Orensanz, J.M., Gagliardini, D.A., 2011. Zooming the macroscope: medium-resolution remote sensing as a framework for the assessment of a small-scale fishery. *ICES J. Mar. Sci.* 68, 696–706. doi:10.1093/icesjms/fsq162
- Antoine, J.M.R., Fung, L.A.H., Grant, C.N., 2017. Assessment of the potential health risks associated with the aluminium, arsenic, cadmium and lead content in selected fruits and vegetables grown in Jamaica. *Toxicol. Reports* 4, 181–187. doi:10.1016/j.toxrep.2017.03.006
- Azizi, G., Akodad, M., Baghour, M., Layachi, M., Moumen, A., 2018. The use of *Mytilus*

- spp. mussels as bioindicators of heavy metal pollution in the coastal environment. A review. *J. Mater. Environ. Sci.* 9, 1170–1181. doi:10.26872/jmes.2018.9.4.129
- Bainy, A.C.D., Saito, E., Carvalho, P.S.M., Junqueira, V.B.C., 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquat. Toxicol.* 34, 151–162. doi:10.1016/0166-445X(95)00036-4
- Bargagli, R., Nelli, L., Ancora, S., Focardi, S., 1996. Elevated cadmium accumulation in marine organisms from Terra Nova Bay (Antarctica). *Polar Biol.* 16, 513–520. doi:10.1007/BF02329071
- Barrera-Escorcia, G., Wong-chang, I., 2010. Lipid peroxidation and metallothionein induction by chromium and cadmium in Oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) from Mandinga Lagoon, Veracruz. *Hidrobiológica* 20, 31–40.
- Barrera, G., Pizzimenti, S., Dianzani, M.U., 2008. Lipid peroxidation: control of cell proliferation, cell differentiation and cell death. *Mol. Aspects Med.* 29, 1–8. doi:10.1016/j.mam.2007.09.012
- Bebianno, M.J., Serafim, M.A., 1998. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. *Sci. Total Environ.* 214, 123–131. doi:10.1016/S0048-9697(98)00059-X
- Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated Biomarker Response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1316–1322. doi:10.1086/597420
- Benali, I., Boutiba, Z., Merabet, A., Chèvre, N., 2015. Integrated use of biomarkers and condition indices in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) for monitoring pollution and development of biomarker index to assess the potential toxic of coastal sites. *Mar. Pollut. Bull.* 95, 385–394. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.03.041
- Benedetti, M., Giuliani, M.E., Regoli, F., 2017. Pro-oxidant challenges and antioxidant adaptation of *Pleuragramma antarctica* in platelet ice, in: Vacchi, M., Pisano, E., Ghigliotti, L. (Eds.), *The Antarctic Silverfish: A Keystone Species in a Changing Ecosystem*. Springer Cham. doi:10.1007/978-3-319-55893-6
- Benedetti, M., Giuliani, M.E., Regoli, F., 2015. Oxidative metabolism of chemical pollutants in marine organisms: Molecular and biochemical biomarkers in

- environmental toxicology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1340, 8–19.
doi:10.1111/nyas.12698
- Bertrand, L., Asis, R., Victoria, M., Valeria, M., 2016. Bioaccumulation and biochemical response in South American native species exposed to zinc: Boosted regression trees as novel tool for biomarkers selection. *Ecol. Indic.* 67, 769–778.
doi:10.1016/j.ecolind.2016.03.048
- Beutler, E., 1982. Catalase, in: Beutler, E. (Ed.), *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. Grune and Stratton, Inc, New York, NY, pp. 105–106.
- Bigatti, G., Primost, M., Cledón, M., Averbuj, A., Theobald, N., Gerwinski, W., Arntz, W., Morriconi, E., Penchaszadeh, P.E., 2009. Biomonitoring of TBT contamination and imposex incidence along 4700 km of Argentinean shoreline (SW Atlantic: From 38S to 54S). *Mar. Pollut. Bull.* 58, 695–701. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.01.001
- Bonetto, J.G., 2019. Exposición a As: Efectos sobre el metabolismo oxidativo y nitrosativo en cerebro. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, 162 pp.
- Bonetto, J.G., Lepori, E.C.V., Puntarulo, S., 2014. Update on the oxidative stress associated with arsenic exposure. *Curr. Top. Toxicol.* 10, 37–48.
- Bouskill, N.J., Handy, R.D., Ford, T.E., Galloway, T.S., 2006. Differentiating copper and arsenic toxicity using biochemical biomarkers in *Asellus aquaticus* and *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 342–9.
doi:10.1016/j.ecoenv.2005.07.027
- Brambila, C.E., Lozano, P., 1999. Metalotioneinas bioquímica y funciones propuestas. *Boletín Educ. Bioquímica* 18, 21–27.
- Brooks, S.J., Escudero-Oñate, C., Gomes, T., Ferrando-Climent, L., 2018. An integrative biological effects assessment of a mine discharge into a Norwegian fjord using field transplanted mussels. *Sci. Total Environ.* 644, 1056–1069.
doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.058
- Bruland, K.W., 1983. Trace elements in sea-water, in: Riley, J.P., Chester, R. (Eds.), *Chemical Oceanography*. Academic Press, London, pp. 157–220.
doi:10.1016/B978-0-12-409548-9.09152-1
- Bryant, V., Newbery, D.M., McLusky, D.S., Campbell, R., 1985. Effect of temperature

- and salinity on the toxicity of arsenic to three estuarine invertebrates (*Corophium volutator*, *Macoma balthica*, *Tubifex costatus*). Mar. Ecol. Prog. Ser. 24, 9. doi:10.3354/meps024129
- Bundschuh, J., Litter, M.I., Parvez, F., Román-Ross, G., Nicolli, H.B., Jean, J.S., Liu, C.W., López, D., Armienta, M.A., Guilherme, L.R.G., Cuevas, A.G., Cornejo, L., Cumbal, L., Toujaguez, R., 2012. One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. Sci. Total Environ. 429, 2–35. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.06.024
- Burton, G.W., Ingold, K.U., 1981. Autoxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants *in vitro*. J. Am. Chem. Soc. 103, 6472–6477.
- Bustamante, P., Miramand, P., 2005. Evaluation of the variegated scallop *Chlamys varia* as a biomonitor of temporal trends of Cd, Cu, and Zn in the field. Environ. Pollut. 138, 109–120. doi:10.1016/j.envpol.2005.02.014
- Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME), 2014. Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life for Cadmium, in: Canadian Environmental Quality Guidelines.
- Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME), 2002. Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Can. Environ. Qual. Guidel.
- Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME), 1997. CCME Arsenic, in: Canadian Environmental Quality Guidelines.
- Chalkiadaki, O., Dassenakis, M., Paraskevopoulou, V., Lydakakis-Simantiris, N., 2014. Experimental study of cadmium bioaccumulation in three Mediterranean marine bivalve species: Correlation with selected biomarkers, in: Pure and Applied Chemistry. pp. 1189–1204. doi:10.1515/pac-2014-0110
- Chandurvelan, R., Marsden, I.D., Gaw, S., Glover, C.N., 2012. Impairment of green-lipped mussel (*Perna canaliculus*) physiology by waterborne cadmium: Relationship to tissue bioaccumulation and effect of exposure duration. Aquat. Toxicol. 124–125, 114–124. doi:10.1016/j.aquatox.2012.07.013
- Chelomin, V.P., Belcheva, N.N., 1991. Alterations of microsomal lipid-synthesis in gill cells of bivalve mollusk *Mizuhopecten yessoensis* in response to cadmium

- accumulation. *Comp. Biochem. Physiol. C-Pharmacology Toxicol. Endocrinol.* 99, 1–5. doi:10.1016/0742-8413(91)90065-2
- Chen, L., Wu, H., Zhao, J., Zhang, W., Zhang, L., Sun, S., Yang, D., Cheng, B., Wang, Q., 2018. The role of GST omega in metabolism and detoxification of arsenic in clam *Ruditapes philippinarum*. *Aquat. Toxicol.* 204, 9–18. doi:10.1016/j.aquatox.2018.08.016
- Ciocco, N.F., 1995. La marisquería mediante buceo en el golfo San José (Chubut, Argentina). Serie: Inf. Técnicos del Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica. Informe Técnico N°2. pp. 37.
- Ciocco, N.F., Lasta, M.L., Bremec, C., 1998. Los moluscos de interés pesquero. Cultivo y estrategias reproductivas de bivalvos y equinoideos, in: Boschi, E.E. (Ed.), *El Mar Argentino y sus recursos pesqueros*. Mar del Plata: Instituto Nacional de Investigacion y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata, pp. 143–166.
- Código Alimentario Argentino (CAA), 2019. Capítulo VI. Alimentos Carneos y Afines.
- Código Alimentario Argentino (CAA), 2012. Capítulo III: De los productos alimenticios (Ley 18.284).
- Comisión Europea, 2008. Reglamento 629/2008 de la Comisión de la UE. D. Of. la Union Eur. L 173/6 2007, 6–9.
- Comoglio, L., Amin, O., Botté, S., Marcovecchio, J., 2011. Use of biomarkers in resident organisms as a tool for environmental monitoring in a cold coastal system, Tierra del Fuego Island. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 382–393. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.10.005
- Conti, M.E., Jasan, R., Finoia, M.G., Iavicoli, I., Plá, R., 2016. Trace elements deposition in the Tierra del Fuego region (south Patagonia) by using lichen transplants after the Puyehue-Cordón Caulle (north Patagonia) volcanic eruption in 2011. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 6574–6583. doi:10.1007/s11356-015-5858-8
- Conti, M.E., Stripeikis, J., Finoia, M.G., Tudino, M.B., 2011. Baseline trace metals in bivalve molluscs from the Beagle Channel, Patagonia (Argentina). *Ecotoxicology* 20, 1341–1353. doi:10.1007/s10646-011-0690-5
- Coppola, F., Almeida, Â., Henriques, B., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Pereira, E., Freitas, R., 2018. Biochemical responses and accumulation patterns of *Mytilus*

- galloprovincialis* exposed to thermal stress and Arsenic contamination. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147, 954–962. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.09.051
- Cravo, A., Pereira, C., Gomes, T., Cardoso, C., Serafim, A., Almeida, C., Rocha, T., Lopes, B., Company, R., Medeiros, A., Norberto, R., Pereira, R., Araújo, O., Bebianno, M.J., 2012. A multibiomarker approach in the clam *Ruditapes decussatus* to assess the impact of pollution in the Ria Formosa lagoon, South Coast of Portugal. *Mar. Environ. Res.* 75, 23–34. doi:10.1016/j.marenvres.2011.09.012
- de Carvalho, C.C.C.R., Caramujo, M.J., 2017. Carotenoids in aquatic ecosystems and aquaculture: a colorful business with implications for human health. *Front. Mar. Sci.* 4. doi:10.3389/fmars.2017.00093
- de Mora, S., Fowler, S.W., Wyse, E., Azemard, S., 2004. Distribution of heavy metals in marine bivalves, fish and coastal sediments in the Gulf and Gulf of Oman. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 410–24. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.02.029
- Del Brio, F., Commendatore, M., Castro, I.B., Gomes Costa, P., Fillmann, G., Bigatti, G., 2016. Distribution and bioaccumulation of butyltins in the edible gastropod *Odontocymbiola magellanica*. *Mar. Biol. Res.* 12, 608–620. doi:10.1080/17451000.2016.1169296
- Desai, I.D., 1984. Vitamin E analysis methods for animal tissues, in: *Methods in Enzymology, Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 138–147. doi:10.1016/S0076-6879(84)05019-9
- Devin, S., Burgeot, T., Giambérini, L., Minguez, L., Pain-Devin, S., 2014. The integrated biomarker response revisited: Optimization to avoid misuse. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 2448–2454. doi:10.1007/s11356-013-2169-9
- Di Salvatore, P., Calcagno, J.A., Ortíz, N., Ríos de Molina, M.D.C., Sabatini, S.E., 2013. Effect of seasonality on oxidative stress responses and metal accumulation in soft tissues of *Aulacomya atra*, a mussel from the South Atlantic Patagonian coast. *Mar. Environ. Res.* 92, 244–252. doi:10.1016/j.marenvres.2013.10.004
- Diniz, M.S., Santos, H.M., Costa, P.M., Peres, I., Costa, M.H., Alves, S., Capelo-Martinez, J.L., 2008. Effects of exposure to arsenic in *Corbicula fluminea*: Evaluation of the histological, histochemical and biochemical responses. *Ciencias Mar.* 34, 307–316. doi:10.7773/cm.v34i3.1396

- Diodato, S., 2013. Respuestas de especies locales a procesos de eutrofización en la zona costera próxima a la ciudad de Ushuaia, Tierra del Fuego. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Argentina, 221 pp.
- Duarte, C.A., Giarratano, E., Amin, O.A., Comoglio, L.I., 2011. Heavy metal concentrations and biomarkers of oxidative stress in native mussels (*Mytilus edulis chilensis*) from Beagle Channel coast (Tierra del Fuego, Argentina). *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1895–904. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.05.031
- Duarte, C.A., Giarratano, E., Gil, M.N., 2012. Trace metal content in sediments and autochthonous intertidal organisms from two adjacent bays near Ushuaia, Beagle Channel (Argentina). *Mar. Environ. Res.* 79, 55–62. doi:10.1016/j.marenvres.2012.05.003
- Edmonds, J.S., Francesconi, K.A., 1993. Arsenic in seafoods: Human health aspects and regulations. *Mar. Pollut. Bull.* 26, 665–674. doi:10.1016/0025-326X(93)90549-Y
- El-Sorogy, A.S., Youssef, M., Al-Kahtany, K., Al-Otaiby, N., 2016. Assessment of arsenic in coastal sediments, seawaters and molluscs in the Tarut Island, Arabian Gulf, Saudi Arabia. *J. African Earth Sci.* 113, 65–72. doi:10.1016/j.jafrearsci.2015.10.001
- Elith, J., Leathwick, J.R., Hastie, T., 2008. A working guide to boosted regression trees. *J. Anim. Ecol.* 77, 802–813.
- Ellwood, M.J., 2004. Zinc and cadmium speciation in subantarctic waters east of New Zealand. *Mar. Chem.* 87, 37–58. doi:10.1016/j.marchem.2004.01.005
- Engel, D.W., Fowler, B.A., 1979. Factors influencing cadmium accumulation and its toxicity to marine organisms. *Environ. Health Perspect.* doi:10.2307/3428908
- Esteves, J.L., Commendatore, M.G., Nievas, M.L., Massara Paletto, V., Amín, O., 2006. Hydrocarbon pollution in coastal sediments of Tierra del Fuego Islands, Patagonia Argentina. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 582–90. doi:10.1016/j.marpolbul.2006.02.015
- European Food Safety Authority (EFSA), 2009. Scientific Opinion on Arsenic in Food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA J.* 7, 1351. doi:10.2903/j.efsa.2009.1351.
- Eusko Jaurlaritz - Gobierno Vasco., 2000. Metales Pesados y Arsénico. Informe técnico, 16 pp. Acceso enero 2019. <http://reciclario.com.ar/herramientas/metales-pesados/>.

- Farcy, E., Burgeot, T., Haberkorn, H., Auffret, M., Lagadic, L., Allenou, J.P., Budzinski, H., Mazzella, N., Pete, R., Heydorff, M., Menard, D., Mondeguer, F., Caquet, T., 2013. An integrated environmental approach to investigate biomarker fluctuations in the blue mussel *Mytilus edulis* L. in the Vilaine estuary, France. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 630–650. doi:10.1007/s11356-012-1316-z
- Farnfield, H.R., Marcilla, A.L., Ward, N.I., 2012. Arsenic speciation and trace element analysis of the volcanic rio Agrio and the geothermal waters of Copahue, Argentina. *Sci. Total Environ.* 433, 371–378. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.05.098
- Fattorini, D., Notti, A., Regoli, F., 2006. Characterization of arsenic content in marine organisms from temperate, tropical, and polar environments. *Chem. Ecol.* 22, 405–414. doi:10.1080/02757540600917328
- Fernández Galindo, B., 2012. Evaluación de respuestas bioquímicas y anormalidades cito-genotóxicas en Mejillon Silvestre (*Mytilus Galloprovincialis*) como Biomarcadores de Contaminacion Marina. Universidad de Murcia.
- Fernández Galindo, B., Campillo, J.A., Martínez-Gómez, C., Benedicto, J., 2010. Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. *Aquat. Toxicol.* 99, 186–97. doi:10.1016/j.aquatox.2010.04.013
- Ferreira, A.C., Costa, A.C.S., Korn, M.D.G.A., 2004. Preliminary evaluation of the cadmium concentration in seawater of the Salvador City, Brazil. *Microchem. J.* 78, 77–83. doi:10.1016/j.microc.2004.03.014
- Figueira, E., Cardoso, P., Freitas, R., 2012. *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* exposed to cadmium: Toxicological effects and bioaccumulation patterns. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 156, 80–86. doi:10.1016/j.cbpc.2012.04.004
- Fleeger, J.W., Carman, K.R., Nisbet, R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 317, 207–33. doi:10.1016/S0048-9697(03)00141-4
- Francesconi, K.A., Edmonds, J.S., 1996. Arsenic and Marine Organisms. *Adv. Inorg. Chem.* 44, 147–189. doi:10.1016/S0898-8838(08)60130-0
- Frias, J.E., Gil, M.N., Esteves, J.L., García Borboroglu, P., Kane, O.J., Smith, J.R.,

- Boersma, P.D., 2012. Mercury levels in feathers of *Magellanic penguins*. Mar. Pollut. Bull. 64, 1265–1269. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.02.024
- Fujisawa, A., Dunlap, W.C., Yamamoto, Y., 2010. Vitamin E protection in the biochemical adaptation of marine organisms to cold-water environments. Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol. 157, 145–158. doi:10.1016/j.cbpb.2010.04.011
- Garla, R., Ganger, R., Mohanty, B.P., Verma, S., Bansal, M.P., Garg, M.L., 2016. Metallothionein does not sequester arsenic(III) ions in condition of acute arsenic toxicity. Toxicology 366–367, 68–73. doi:10.1016/j.tox.2016.08.008
- Gaxiola-Robles, R., Labrada-Martagon, V., Celina Mendez-Rodriguez, L., Olimpia Olguin-Monroy, N., Carolina Castillo-Castaneda, P., Zenteno-Savin, T., 2013. Interaction between Selenium (Se) and Mercury (Hg) Affects the Activity of Glutathione S-Transferase in Breast Milk; Possible Relationship with Fish and Shellfish Intake. Free Radic. Biol. Med. 65, S112. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.673
- Giarratano, E., Amin, O.A., 2010. Heavy metals monitoring in the southernmost mussel farm of the world (Beagle Channel, Argentina). Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 1378–1384. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.06.023
- Giarratano, E., Duarte, C.A., Amin, O.A., 2010. Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal waters of the Beagle Channel. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 270–9. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.10.009
- Giarratano, E., Gil, M.N., Malanga, G., 2014. Biomarkers of environmental stress in gills of ribbed mussel *Aulacomya atra atra* (Nuevo Gulf, Northern Patagonia). Ecotoxicol. Environ. Saf. 107, 111–119. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.05.003
- Giarratano, E., Gil, M.N., Malanga, G., 2013. Assessment of antioxidant responses and trace metal accumulation by digestive gland of ribbed mussel *Aulacomya atra atra* from Northern Patagonia. Ecotoxicol. Environ. Saf. 92, 39–50. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.02.007
- Giarratano, E., Gil, M.N., Malanga, G., 2011. Seasonal and pollution-induced variations in biomarkers of transplanted mussels within the Beagle Channel. Mar. Pollut. Bull. 62, 1337–44. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.03.037

- Giarratano, E., Gil, M.N., Marinho, C.H., Malanga, G., 2016. Metals from mine waste as potential cause of oxidative stress in burrowing crab *Neohelice granulata* from San Antonio bay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 132, 68–76. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.05.029
- Gil, M., Torres, A., Harvey, M., Esteves, J.L., 2006. Metales pesados en organismos marinos de la zona costera de la Patagonia argentina continental. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 41, 167 – 176.
- Gil, M.N., Harvey, M.A., Esteves, J.L., 1999. Heavy metals in intertidal surface sediments from the Patagonian Coast, Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* doi:10.1007/s001289900947
- Gil, M.N., Harvey, M.A., Esteves, J.L., 1988. Metal content in bivalve molluscs from the San José and Nuevo Gulfs, Patagonia Argentina. *Mar. Pollut. Bull.* 19, 181–182. doi:10.1016/0025-326X(88)90676-5
- Gil, M.N., Torres, A., Harvey, M., Esteves, L., 2006a. Metales pesados en organismos marinos de la zona costera de la Patagonia argentina continental of Continental Argentine Patagonia. *Biol. Mar. y Ocenografía* 41, 167–176.
- Gil, M.N., Torres, A.I., Commendatore, M.G., Marinho, C., Arias, A., Giarratano, E., Casas, G.N., 2015. Nutritive and xenobiotic compounds in the alien Algae *Undaria pinnatifida* from Argentine Patagonia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 553–565. doi:10.1007/s00244-014-0090-y
- Gil, M.N., Torres, A.I., Harvey, M., Esteves, L., Esteves, J.L., 2006b. Metales pesados en organismos marinos de la zona costera de la Patagonia argentina continental. *Biol. Mar. y Ocenografía* 41, 167–176.
- Gould, E., Thompson, R.J., Buckley, L.J., Rusanowsky, D., Sennefelder, G.R., 1988. Uptake and effects of copper and cadmium in the gonad of the scallop *Placopecten magellanicus*: concurrent metal exposure. *Mar. Biol.* 97, 217–223.
- Griboff, J., Wunderlin, D.A., Monferran, M. V., 2017. Metals, As and Se determination by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in edible fish collected from three eutrophic reservoirs. Their consumption represents a risk for human health? *Microchem. J.* 130, 236–244. doi:10.1016/j.microc.2016.09.013
- Guerra, C., Zenteno-Savín, T., Maeda-Martínez, A.N., Abele, D., Philipp, E.E.R., 2013.

- The effect of predator exposure and reproduction on oxidative stress parameters in the Catarina scallop *Argopecten ventricosus*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 165, 89–96. doi:10.1016/j.cbpa.2013.02.006
- Guidi, P., Frenzilli, G., Benedetti, M., Bernardeschi, M., Falleni, A., Fattorini, D., Regoli, F., Scarcelli, V., Nigro, M., 2010. Antioxidant, genotoxic and lysosomal biomarkers in the freshwater bivalve (*Unio pictorum*) transplanted in a metal polluted river basin. *Aquat. Toxicol.* 100, 75–83. doi:10.1016/j.aquatox.2010.07.009
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Harvey, M.A., Gil, M.N., 1988. Concentrations of some trace elements in recent sediments from the San José and Nuevo Gulfs, Patagonia Argentina. *Mar. Pollut. Bull.* 19, 394–396. doi:10.1016/0025-326X(88)90276-7
- Hernández-Moresino, R.D., Di Mauro, R., Crespi-Abril, A.C., Villanueva-Gomila, G.L., Compaire, J.C., Barón, P.J., 2017. Contrasting structural patterns of the mesozooplankton community result from the development of a frontal system in San José Gulf, Patagonia. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 193, 1–11. doi:10.1016/j.ecss.2017.05.012
- Hughes, M.F., Beck, B.D., Chen, Y., Lewis, A.S., Thomas, D.J., 2011. Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective. *Toxicol. Sci.* 123, 305–332. doi:10.1093/toxsci/kfr184
- International Agency for Research on Cancer, 2012. Arsenic, metals, fibres and dusts., IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC Press, International Agency for Research on Cancer.
- Isani, G., Andreani, G., Kindt, M., Carpenè, E., 2000. Metallothioneins (MTs) in marine molluscs. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 46, 311–330.
- Ji, R., Pan, L., Guo, R., Zheng, L., Zhang, M., 2019. Using multi-integrated biomarker indexes approach to assess marine quality and health status of marine organism: a case study of *Ruditapes philippinarum* in Laizhou Bay, China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2008, 9916–9930. doi:10.1007/s11356-018-04082-1
- Jurkiewicz, B.A., Buettner, G.R., 1994. Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study. *Photochem. Photobiol.* 59, 1–4.

- Kalia, K., Khambholja, D.B., 2015. Arsenic contents and its biotransformation in the marine environment, in: Flora, S.J.. (Ed.), Handbook of Arsenic Toxicology. Elsevier Inc., pp. 675–700. doi:10.1016/B978-0-12-418688-0.00028-9
- Kotake, Y., Tanigawa, T., Tanigawa, M., Ueno, I., Allen, D.R., Lai, C.S., 1996. Continuous monitoring of cellular nitric oxide generation by spin trapping with an iron-dithiocarbamate complex. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1289, 362–368. doi:10.1016/0304-4165(95)00172-7
- Krishnakumar, P.K., Qurban, M.A., Stiboller, M., Nachman, K.E., Joydas, T. V., Manikandan, K.P., Mushir, S.A., Francesconi, K.A., 2016. Arsenic and arsenic species in shellfish and finfish from the western Arabian Gulf and consumer health risk assessment. *Sci. Total Environ.* 566, 1235–1244. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.05.180
- La Porte, P.F., 2005. *Mytilus trossulus* hsp70 as a biomarker for arsenic exposure in the marine environment: laboratory and real-world results. *Biomarkers Biochem. Indic. Expo. response, susceptibility to Chem.* 10, 417–28. doi:10.1080/13547500500264371
- Lai, V.W.-M., Cullen, W.R., Ray, S., 1999. Arsenic speciation in scallops. *Mar. Chem.* 66, 81–89. doi:10.1016/S0304-4203(99)00025-0
- Lamela, P.A., Navoni, J.A., Pérez, R.D., Pérez, C.A., Vodopivec, C.L., Curtosi, A., Bongiovanni, G.A., 2019. Analysis of occurrence, bioaccumulation and molecular targets of arsenic and other selected volcanic elements in Argentinean Patagonia and Antarctic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 681, 379–391. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.05.096
- Lattuca, M.E., Malanga, G., Aguilar Hurtado, C., Pérez, A.F., Calvo, J., Puntarulo, S., 2009. Main features of the oxidative metabolism in gills and liver of *Odontesthes nigricans* Richardson (Pisces, Atherinopsidae). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 154, 406–11. doi:10.1016/j.cbpb.2009.08.004
- Liu, N., Pan, L., Wang, J., Yang, H., Liu, D., 2012. Application of the biomarker responses in scallop (*Chlamys farreri*) to assess metals and PAHs pollution in Jiaozhou Bay, China. *Mar. Environ. Res.* 80, 38–45. doi:10.1016/j.marenvres.2012.06.008

- López Tévez, L., 2016. Estudio de Complejos Metálicos con Ligandos de interés Biológico. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina, 166 pp.
- Lowry, O.H., Rosebrough, J.N., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275. doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30. doi:10.1016/j.aquatox.2010.10.006
- Macías-Mayorga, D., Laiz, I., Moreno-Garrido, I., Blasco, J., 2015. Is oxidative stress related to cadmium accumulation in the Mollusc *Crassostrea angulata*? *Aquat. Toxicol.* 161, 231–241. doi:10.1016/j.aquatox.2015.02.007
- Malanga, G., Estevez, M.S., Calvo, J., Abele, D., Puntarulo, S., 2007. The effect of seasonality on oxidative metabolism in *Nacella (Patinigera) magellanica*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 146, 551–558. doi:10.1016/j.cbpa.2006.01.029
- Mandal, B.K., 2015. Changing concept of arsenic toxicity with development of speciation techniques, in: *Handbook of Arsenic Toxicology*. Elsevier Inc., pp. 179–201. doi:10.1016/B978-0-12-418688-0.00007-1
- Mandal, B.K., Suzuki, K.T., 2002. Arsenic round the world: a review. *Talanta* 58, 201–235. doi:10.1016/S0065-2113(08)70013-0
- Mardirosian, M.N., 2015. Ecotoxicología del arsénico y mecanismos de acción en el desarrollo del anfibio *Rhinella arenarum*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina, 196 pp.
- Marinho, C.H., 2011. Evaluación de la presencia de metales pesados en sedimentos y organismos de la Zona Norte del Golfo San Jorge.
- Marinho, C.H., Giarratano, E., Esteves, J.L., Narvarte, M.A., Gil, M.N., 2017. Hazardous metal pollution in a protected coastal area from Northern Patagonia (Argentina). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 6724–6735. doi:10.1007/s11356-017-8393-y
- Marsden, I.D., Cranford, P.J., 2016. Scallops and Marine Contaminants, in: *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier B.V., pp. 567–584. doi:10.1016/B978-0-444-62710-0.00013-4

- Martino, J., Wise, S.S., Perkins, C., Kerr, I., Rowntree, V.J., Sironi, M., 2012. Metal levels in southern right whale (*Eubalaena australis*) skin biopsies from Península Valdés, Argentina. *J. cetacean Res. Manag.* 1–9.
- Martorell, I., Perelló, G., Martí-Cid, R., Llobet, J.M., Castell, V., Domingo, J.L., 2011. Human exposure to arsenic, cadmium, mercury, and lead from foods in catalonia, Spain: Temporal trend. *Biol. Trace Elem. Res.* 142, 309–322. doi:10.1007/s12011-010-8787-x
- Maulvault, A.L., Anacleto, P., Barbosa, V., Sloth, J.J., Rasmussen, R.R., Tediosi, A., Fernandez-Tejedor, M., van den Heuvel, F.H.M., Kotterman, M., Marques, A., 2015. Toxic elements and speciation in seafood samples from different contaminated sites in Europe. *Environ. Res.* 1–10. doi:10.1016/j.envres.2015.09.016
- Maulvault, A.L., Camacho, C., Barbosa, V., Alves, R., Anacleto, P., Fogaça, F., Kwadijk, C., Kotterman, M., Cunha, S.C., Fernandes, J.O., Rasmussen, R.R., Sloth, J.J., Aznar-Alemany, Ò., Eljarrat, E., Barceló, D., Marques, A., 2018. Assessing the effects of seawater temperature and pH on the bioaccumulation of emerging chemical contaminants in marine bivalves. *Environ. Res.* 161, 236–247. doi:10.1016/j.envres.2017.11.017
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- McGeer, J.C., Niyogi, S., Scott Smith, D., 2011. Cadmium. *Fish Physiol.* 31, 125–184. doi:10.1016/S1546-5098(11)31025-4
- Meador, J.P., Ernest, D.W., Kagley, A., 2004. Bioaccumulation of arsenic in marine fish and invertebrates from Alaska and California. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47, 223–33. doi:10.1007/s00244-004-3035-z
- Metian, M., Bustamante, P., Hédouin, L., Warnau, M., 2008. Accumulation of nine metals and one metalloid in the tropical scallop *Comptopallium radula* from coral reefs in New Caledonia. *Environ. Pollut.* 152, 543–552. doi:10.1016/j.envpol.2007.07.009
- Metian, M., Warnau, M., Oberhänsli, F., Teyssié, J.-L., Bustamante, P., 2007. Interspecific comparison of Cd bioaccumulation in European Pectinidae (*Chlamys varia* and *Pecten maximus*). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 353, 58–67.

- doi:10.1016/j.jembe.2007.09.001
- Milinkovitch, T., Bustamante, P., Huet, V., Reigner, A., Churlaud, C., Thomas-Guyon, H., 2015. In situ evaluation of oxidative stress and immunological parameters as ecotoxicological biomarkers in a novel sentinel species (*Mimachlamys varia*). *Aquat. Toxicol.* 161, 170–5. doi:10.1016/j.aquatox.2015.02.003
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The purification and properties of Superoxide Dismutase from *Neurospora Crassa*. *J. Biol. Chem.* 247, 3410–3414.
- Mohamed, N., 2008. Evaluación de la concentración de metales pesados en moluscos bivalvos, material particulado y sedimentos de la zona costera del Chubut. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Sede Puerto Madryn.
- Moncaleano-Niño, A.M., Luna-Acosta, A., Gómez-Cubillos, M.C., Villamil, L., Ahrens, M.J., 2018. Cholinesterase activity in the cup oyster *Saccostrea* sp. exposed to chlorpyrifos, imidacloprid, cadmium and copper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 151, 242–254. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.12.057
- Moreira, A., Figueira, E., Mestre, N.C., Schrama, D., Soares, A.M.V.M., Freitas, R., Bebianno, M.J., 2018. Impacts of the combined exposure to seawater acidification and arsenic on the proteome of *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 203, 117–129. doi:10.1016/j.aquatox.2018.07.021
- Moreira, S.M., Guilhermino, L., 2005. The use of *Mytilus Galloprovincialis* acetylcholinesterase and glutathione S-transferases activities as biomarkers of environmental contamination along the northwest Portuguese coast. *Environ. Monit. Assess.* 105, 309–325. doi:10.1007/s10661-005-3854-z
- Moschino, V., Del Negro, P., De Vittor, C., Da Ros, L., 2016. Biomonitoring of a polluted coastal area (Bay of Muggia, Northern Adriatic Sea): A five-year study using transplanted mussels. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 128, 1–10. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.02.006
- Myrnes, B., Nilsen, I.W., 2007. Glutathione S-transferase from the Icelandic scallop (*Chlamys islandica*): Isolation and partial characterization. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 144, 403–407. doi:10.1016/j.cbpc.2006.11.011
- Nardi, A., Benedetti, M., Fattorini, D., Regoli, F., 2018. Oxidative and interactive

- challenge of cadmium and ocean acidification on the smooth scallop *Flexopecten glaber*. *Aquat. Toxicol.* 196, 53–60. doi:10.1016/j.aquatox.2018.01.008
- Narvarte, M.A., 2003. Growth and survival of the tehuelche scallop *Aequipecten tehuelchus* in culture. *Aquaculture* 216, 127–142. doi:10.1016/S0044-8486(02)00430-1
- Narvarte, M.A., 1995. Spat Collection and Growth to Commercial Size of the Tehuelche Scallop *Aequipecten tehuelchus* (D'Orb.) in the San Matias Gulf, Patagonia, Argentina. *J. World Aquac. Soc.* 26, 59–64. doi:10.1111/j.1749-7345.1995.tb00209.x
- Neff, J.M., 2002a. Arsenic in the Ocean, in: *Bioaccumulation in Marine Organisms*. pp. 57–78. doi:10.1016/B978-008043716-3/50004-X
- Neff, J.M., 2002b. Cadmium in the Ocean, in: *Bioaccumulation in Marine Organisms*. Elsevier, pp. 89–102. doi:10.1016/B978-008043716-3/50006-3
- Neff, J.M., 1997. Ecotoxicology of arsenic in the marine environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 917–927. doi:10.1002/etc.5620160511
- Nelson, D.A., Calabrese, A., Nelson, B.A., MacInnes, J.R., Wenzloff, D.R., 1976. Biological effects of heavy metals on juvenile bay scallops, *Argopecten irradians*, in short-term exposures. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 16, 275–282. doi:10.1007/BF01685889
- Nelson, D.A., Miller, J.E., Calabrese, A., 1988. Effect of heavy metals on bay scallops, surf clams, and blue mussels in acute and long-term exposures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17, 595–600. doi:10.1007/BF01055828
- Ng, T.Y.T., Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., Amiard, J.C., Wang, W.X., 2005. Physico-chemical form of trace metals accumulated by phytoplankton and their assimilation by filter-feeding invertebrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 299, 179–191. doi:10.3354/meps299179
- Nordstrom, D.K., 2002. Worldwide Occurrences of Arsenic in Ground Water. *Sci. Mag* 296, 64–65. doi:10.1007/b101867
- Pascual, M.S., Zampatti, E.A., 1998. Cultivos de moluscos bivalvos, in: Boschi, E.E. (Ed.), *El Mar Argentino y sus recursos pesqueros*. Mar del Plata: Instituto Nacional de Investigacion y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata, pp. 167–193.

- Peake, B.M., Marsden, I.D., Ashoka, S., Bremner, G., 2010. Interspecific and geographical variation in trace metal concentrations of New Zealand scallops. *J. Shellfish Res.* 29, 387–394. doi:10.2983/035.029.0215
- Pempkowiak, J., Sikora, A., Biernacka, E., 1999. Speciation of heavy metals in marine sediment vs their bioaccumulation by mussels. *Chemosphere* 39, 313–321. doi:10.1016/S0045-6535(99)00112-5
- Pérez, A.A., Fajardo, M.A., Strobl, A.M., Pérez, L.B., Piñeiro, A., 2005. Contenido de plomo, cromo y cadmio en moluscos comestibles del Golfo San Jorge (Argentina). *Acta Toxicol. Argent.* 13, 20–25.
- Pérez, A.A., Farías, S.S., Strobl, A.M., Pérez, L.B., López, C.M., Piñeiro, A., Roses, O., Fajardo, M.A., 2007. Levels of essential and toxic elements in *Porphyra columbina* and *Ulva* sp. from San Jorge Gulf, Patagonia Argentina. *Sci. Total Environ.* 376, 51–59. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.11.013
- Phillips, D.J.H., 1990. Arsenic in aquatic organisms: a review, emphasizing chemical speciation. *Aquat. Toxicol.* 16, 151–186. doi:10.1016/0166-445X(90)90036-O
- Pires, A., Figueira, E., Moreira, A., Soares, A.M.V.M., Freitas, R., 2015. The effects of water acidification, temperature and salinity on the regenerative capacity of the polychaete *Diopatra neapolitana*. *Mar. Environ. Res.* 106, 30–41. doi:10.1016/j.marenvres.2015.03.002
- Power, A., Sheehan, D., 1996. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. C-Pharmacology Toxicol. Endocrinol.* 114, 99–103. doi:10.1016/0742-8413(96)00024-2
- Primost, M., Gil, M.N., Bigatti, G., 2017. High bioaccumulation of cadmium and other metals in Patagonian edible gastropods. *Mar. Biol. Res.* 13, 774–781. doi:10.1080/17451000.2017.1296163
- Quinn, B., Gagné, F., Weber, J.P., Blaise, C., 2005. Ecotoxicological effects of a semi-submerged municipal dump (Castle harbour, Bermuda) on the Calico scallop *Argopecten gibbus*. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 534–544. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.07.019
- Radi, R., 2018. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in

- molecular medicine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 115, 5839–5848. doi:10.1073/pnas.1804932115
- Rank, J., Lehtonen, K.K., Strand, J., Laursen, M., 2007. DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. Aquat. Toxicol. 84, 50–61. doi:10.1016/j.aquatox.2007.05.013
- Raspor, B., Erk, M., Pavičić, J., Jurič, D., Kwokal, Ž., 1999. Metallothionein as biomarker of mussel exposure to heavy metals. Mar. Pollution. IAEA-TECDOC-1094 151–156.
- Regoli, F., 1998. Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 34, 48–63. doi:10.1007/s002449900285
- Regoli, F., Elisa, M., Benedetti, M., Arukwe, A., 2011. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. Aquat. Toxicol. 105, 56–66. doi:10.1016/j.aquatox.2011.06.014
- Regoli, F., Giuliani, M.E., 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. Mar. Environ. Res. 93, 106–17. doi:10.1016/j.marenvres.2013.07.006
- Regoli, F., Principato, G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. Aquat. Toxicol. 31, 143–164. doi:10.1016/0166-445X(94)00064-W
- Repetto, M., Semprine, J., Boveris, A., 2012. Lipid Peroxidation: Chemical mechanism, biological implications and analytical determination, in: Lipid Peroxidation. InTech, pp. 3–30. doi:10.5772/45943
- Ridgeway, G., 2013. GBM: Generalized Boosted Regression Models. R Package Version 2.1. <http://CRAN.R-project.org/package=gbm>.
- Rikans, L.E., Hornbrook, K.R., 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. 1362, 116–127. doi:10.1016/S0925-4439(97)00067-7

- Rosas, C.L., Gil, M.N., Uhart, M.M., 2012. Trace metal concentrations in Southern Right Whale (*Eubalaena australis*) at Península Valdés, Argentina. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 1255–1260. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.02.026
- Saavedra, Y., González, A., Blanco, J., 2008. Anatomical distribution of heavy metals in the scallop *Pecten maximus*. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 25, 1339–1344. doi:10.1080/02652030802163398
- Saldívar, O.L., Tovar, T.A., Fortoul van der Goes, T., 1997. Cadmio, in: *Introducción a La Toxicología Ambiental*. pp. 211–226.
- Salgado, S.G., 2013. Estudios de especiación de arsénico y acumulación de metales en muestras de interés medioambiental. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España, 400 pp.
- Sañudo-Wilhelmy, S.A., Flegal, A.R., 1996. Trace Metal Concentrations in the Surf Zone and in Coastal Waters off Baja California, Mexico. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1575–1580. doi:10.1021/es9505560
- Sarkar, S.K., Cabral, H., Chatterjee, M., Cardoso, I., Bhattacharya, A.K., Satpathy, K.K., Alam, M.A., 2008. Biomonitoring of heavy metals using the bivalve molluscs in Sunderban mangrove wetland, northeast coast of Bay of Bengal (India): Possible risks to human health. *Clean - Soil, Air, Water* 36, 187–194. doi:10.1002/clen.200700027
- Schmidt, W., Power, E., Quinn, B., 2013. Seasonal variations of biomarker responses in the marine blue mussel (*Mytilus* spp.). *Mar. Pollut. Bull.* 74, 50–55. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.07.033
- Segovia-Zavala, J., Delgadillo-Hinojosa, F., Alvarez-Borrego, S., 1998. Cadmium in the Coastal Upwelling Area Adjacent to the California – Mexico Border. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 46, 475–481. doi:10.1006/ecss.1997.0296
- Serafim, A., Bebianno, M.J., 2007. Kinetic model of cadmium accumulation and elimination and metallothionein response in *Ruditapes decussatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 960–969. doi:10.1897/06-237R.1
- Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Fonseca, V.F., Frana, S., Vasconcelos, R.P., Bebianno, M.J., Cabral, H.N., 2012. Application of an integrated biomarker response index (IBR) to assess temporal variation of environmental quality in two

- Portuguese aquatic systems. *Ecol. Indic.* 19, 215–225. doi:10.1016/j.ecolind.2011.08.009
- Shaw, J.P., Large, A.T., Livingstone, D.R., Doyotte, A., Renger, J., Chipman, J.K., Peters, L.D., 2002. Elevation of cytochrome P450-immunopositive protein and DNA damage in mussels (*Mytilus edulis*) transplanted to a contaminated site. *Mar. Environ. Res.* 54, 505–509. doi:10.1016/S0141-1136(02)00191-5
- Shenai-Tirodkar, P.S., Gauns, M.U., Mujawar, M.W.A., Ansari, Z.A., 2017. Antioxidant responses in gills and digestive gland of oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston) under lead exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 142, 87–94. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.03.056
- Smedley, P.L., Kinniburgh, D.G., 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochemistry* 17, 517–568. doi:10.1016/S0883-2927(02)00018-5
- Sobrino-Figueroa, A.S., Cáceres-Martínez, C., Botello, A. V, Nunez-Nogueira, G., 2007. Effect of cadmium, chromium, lead and metal mixtures on survival and growth of juveniles of the scallop *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842). *J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 42, 1443–1447. doi:10.1080/10934520701480821
- Soria, G., Lobo Orensanz, J.M., Morsán, E.M., Parma, A.M., Amoroso, R.O., 2016. Scallops Biology, Fisheries, and Management in Argentina, in: *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. pp. 1019–1046. doi:10.1016/B978-0-444-62710-0.00025-0
- Storelli, M.M., 2008. Potential human health risks from metals (Hg, Cd, and Pb) and polychlorinated biphenyls (PCBs) via seafood consumption: Estimation of target hazard quotients (THQs) and toxic equivalents (TEQs). *Food Chem. Toxicol.* 46, 2782–2788. doi:10.1016/j.fct.2008.05.011
- Sturgeon, R.E., Berman, S.S., Desaulniers, A., Russell, D.S., 1980. Pre-concentration of trace metals from sea-water for determination by graphite-furnace atomic-absorption spectrometry. *Talanta* 27, 85–94. doi:10.1016/0039-9140(80)80023-3
- Swiecky, C., 2006. Epidemiología del hidroarsenicismo crónico regional endémico en la República Argentina. *Estud. Colab. multicéntrico. Asoc. Toxicológica Argentina*.

- Secr. del Ambient. y Desarro. Sustentable. Argentina 76.
- Toro-Restrepo, B., 2011. Uso de los biomarcadores en la evaluación de la contaminación. Luna Azul 121–127.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2007. Method 3051A (SW-846): Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, and oils. Washington, DC.
- U.S. Environmental Protection Agency, 1996. Method 3052: Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. Washington, DC.
- U.S. Environmental Protection Agency, 1991. Integrated Risk Information System (IRIS) Chemical Assessment Summary: Arsenic (Inorganic).
- U.S. Environmental Protection Agency, 1989. Integrated Risk Information System (IRIS) Chemical Assessment Summary: Cadmium.
- Uthe, J.F., Chou, C.L., 1987. Cadmium in Sea Scallop (*Piscolopetes magellanicus*) tissues from clean and contaminated areas. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44, 91–98. doi:10.1139/f87-011
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicol. Environ. Saf. 64, 178–89. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.03.013
- Van Der Oost, R., Goksøyr, A., Celander, M., Heida, H., Vermeulen, N.P.E., 1996. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). II. Biomarkers: Pollution-induced responses. Aquat. Toxicol. 36, 189–222. doi:10.1016/S0166-445X(96)00802-8
- Vázquez, N.N., Gil, M.A., Esteves, J.L., Narvarte, M.A., 2007. Monitoring heavy metal pollution in San Antonio Bay, Río Negro, Argentina. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 79, 121–125. doi:10.1007/s00128-007-9084-z
- Velez, C., Figueira, E., Soares, A.M.V.M., Freitas, R., 2016a. Native and introduced clams biochemical responses to salinity and pH changes. Sci. Total Environ. 566–567, 260–268. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.05.019
- Velez, C., Freitas, R., Antunes, S.C., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., 2016b. Clams sensitivity towards As and Hg: A comprehensive assessment of native and exotic

- species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 125, 43–54. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.11.030
- Velez, C., Pires, A., Sampaio, L., Cardoso, P., Moreira, A., Leandro, S., Figueira, E., Soares, A.M.V.M., Freitas, R., 2016c. The use of *Cerastoderma glaucum* as a sentinel and bioindicator species: Take-home message. *Ecol. Indic.* 62, 228–241. doi:10.1016/j.ecolind.2015.10.051
- Verbost, P.M., Flik, G., Lock, R.A.C., Wendelaar Bonga, S.E., 1987. Cadmium inhibition of Ca^{2+} uptake in rainbow trout gills. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 253. doi:10.1152/ajpregu.1987.253.2.r216
- Viarengo, A., Burlando, B., Dondero, F., Marro, A., Fabbri, R., 1999. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers* 4, 455–66. doi:10.1080/135475099230615
- Viarengo, A., Canesi, L., Garcia Martinez, P., Peters, L.D., Livingstone, D.R., 1995. Pro-oxidant processes and antioxidant defence systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*). *Comp. Biochem. Physiol. - Part B Biochem.* 111, 119–126. doi:10.1016/0305-0491(94)00228-M
- Viarengo, A., Canesi, L., Mazzucotelli, A., Ponzano, E., 1993. Cu, Zn and Cd content in different tissues of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*: role of metallothionein in heavy metal homeostasis and detoxication. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 95, 163–168. doi:10.3354/meps095163
- Viarengo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp.* 104, 355–372. doi:10.1016/0742-8413(93)90001-2
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* 44, 69–84. doi:10.1016/S0141-1136(96)00103-1
- WHO/FAO, 2011. Evaluation of certain contaminants in food: Seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives., WHO Technical Report Series.
- WHO, 2011. Guidelines for drinking-water quality - 4th ed., World Health Organization

- Library. doi:10.1016/S1462-0758(00)00006-6
- Widdows, J., Phelps, D.K., Galloway, W., 1981. Measurement of physiological condition of mussels transplanted along a pollution gradient in Narragansett Bay. *Mar. Environ. Res.* 4, 181–194. doi:10.1016/0141-1136(81)90033-7
- Wu, R.S.S., Siu, W.H.L., Shin, P.K.S., 2005. Induction, adaptation and recovery of biological responses: Implications for environmental monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 623–634. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.04.016
- Yebra, M.C., García, A., Carro, N., Moreno-Cid, A., Puig, L., 2002. Design of a field flow preconcentration system for cadmium determination in seawater by flow-injection-atomic absorption spectrometry. *Talanta* 56, 777–785. doi:10.1016/S0039-9140(01)00636-1
- Youssef, M., El-Sorogy, A., Al Kahtany, K., Al Otiaby, N., 2015. Environmental assessment of coastal surface sediments at Tarut Island, Arabian Gulf (Saudi Arabia). *Mar. Pollut. Bull.* 96, 424–433. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.05.010
- Yusof, A.M., Ikhsan, Z.B., Wood, A.K.H., 1994. The speciation of arsenic in seawater and marine species. *J. Radioanal. Nucl. Chem. Artic.* 179, 277–283. doi:10.1007/BF02040162
- Zapata, M., Lang, M., Riso, R., Moraga, D., Riquelme, C., 2012. Trace metal and biomarker levels in tissues of *Argopecten purpuratus* in the north of Chile, and the potential use of this species as a bioindicator of metallic stress. *Aquat. Living Resour.* 25, 259–267. doi:10.1051/alr/2012024
- Zhang, B., Shi, Z., Wang, X., Deng, S., Lin, H., 2015. Depuration of cadmium from blue mussel (*Mytilus edulis*) by hydrolysis peptides and chelating metal elements. *Food Res. Int.* 73, 162–168. doi:10.1016/j.foodres.2014.12.043
- Zhang, H., Reynolds, M., 2019. Cadmium exposure in living organisms: A short review. *Sci. Total Environ.* 678, 761–767. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.04.395
- Zhang, W., Guo, Z., Zhou, Y., Liu, H., Zhang, L., 2015. Biotransformation and detoxification of inorganic arsenic in Bombay oyster *Saccostrea cucullata*. *Aquat. Toxicol.* 158, 33–40. doi:10.1016/j.aquatox.2014.10.021
- Zorita, I., Bilbao, E., Schad, A., Cancio, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., 2007. Tissue- and cell-specific expression of metallothionein genes in cadmium- and copper-exposed

- mussels analyzed by *in situ* hybridization and RT-PCR. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220, 186–196. doi:10.1016/j.taap.2007.01.003
- Zuykov, M., Pelletier, E., Harper, D.A.T., 2013. Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere* 93, 201–208. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.05.001