

Biomarcadores en Ecotoxicología

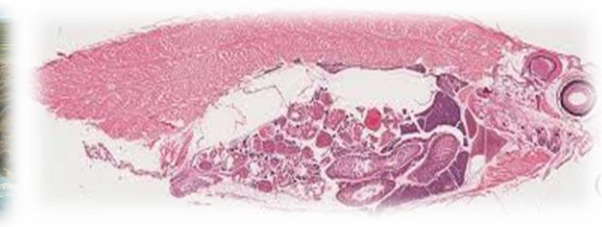


Katherine Jiménez Quesada
Maestría Ecotoxicología Tropical
Universidad Nacional

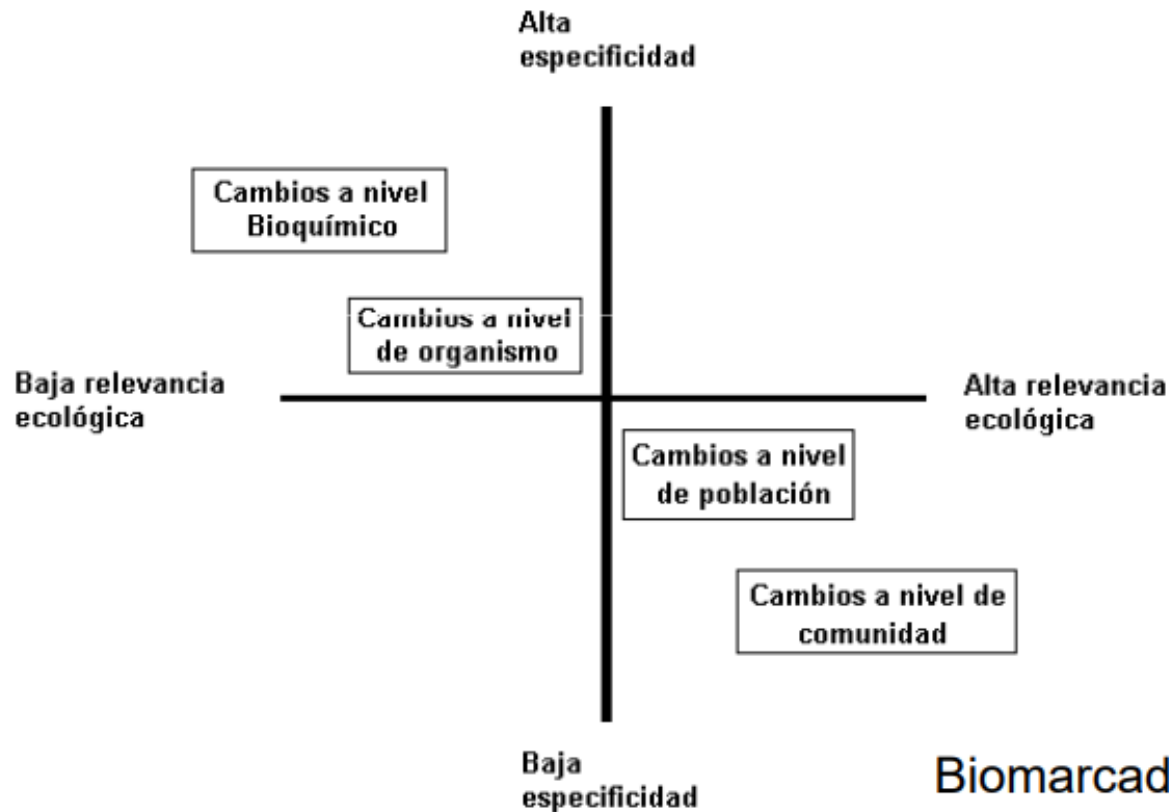
BIOMARCADORES

Cambios en la respuesta biológica normal a nivel molecular, celular, bioquímico, fisiológico o de comportamiento, que se miden en células, fluidos corporales, tejidos u órganos de un individuo y que puede ser indicativo de la exposición y/o efectos de agentes tóxicos en el ambiente

(Vidal-Liñán & Bellas, 2013).



Ubicación de biomarcadores en estudios ambientales



- **Baja relevancia ecológica**
- **Alta sensibilidad**
- **Respuesta temprana**



Biomarcadores → Complemento del monitoreo

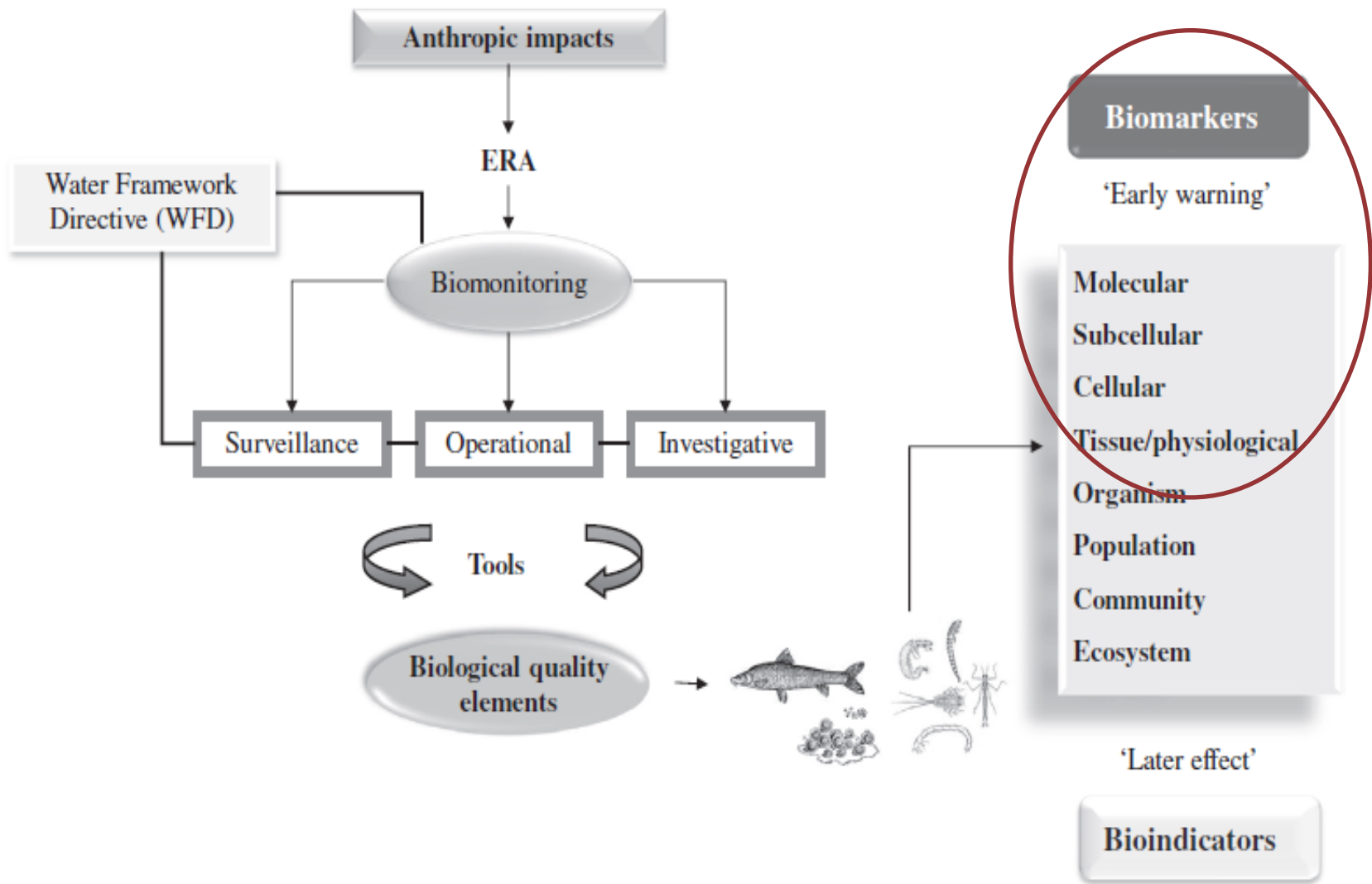


Fig. 1. Applications of biomarker responses within the scheme of the EU's Water Framework Directive for the assessment of the status of water bodies across member states using biological quality elements (bio-indicators).

Necesidad de herramientas rápidas y sensibles para revelar efectos subletales en los organismos acuáticos.



Biomarcador ideal:

Relevancia

Fiabilidad

Robustez

Capacidad de respuesta

Reproducibilidad.

(Hopkin, 1993)

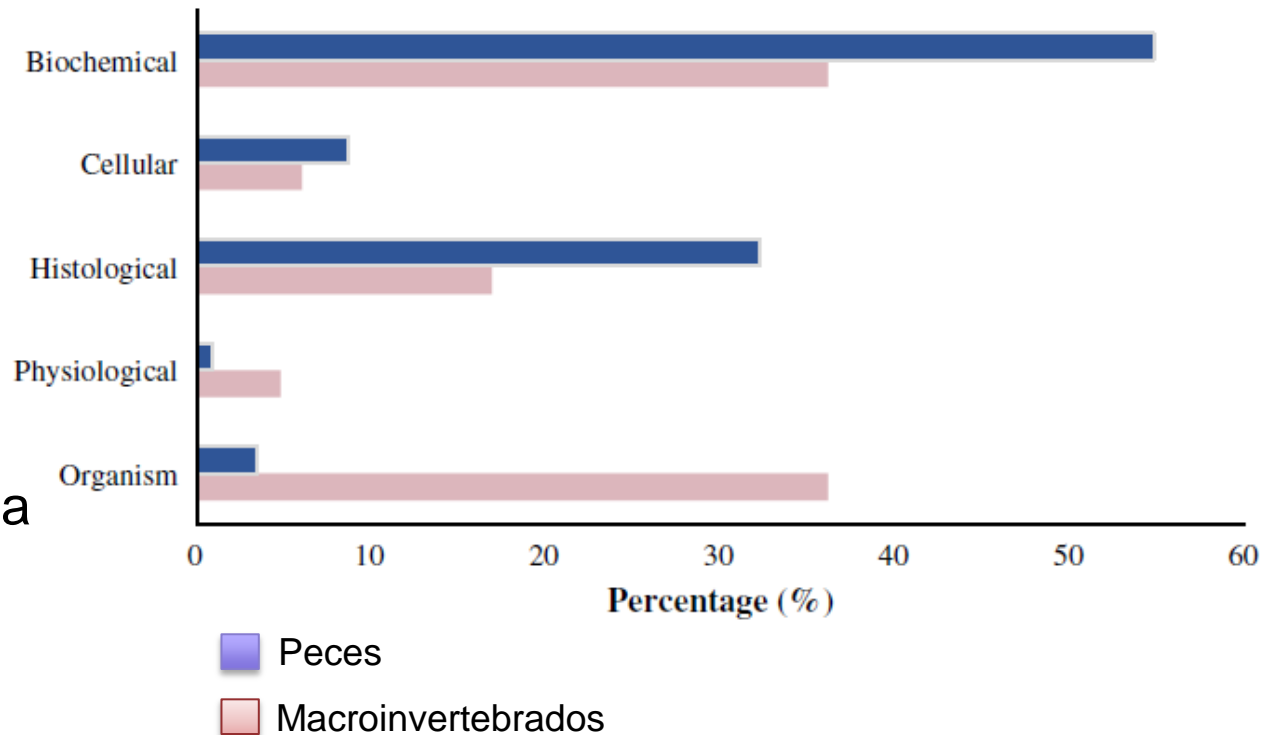


Fig. 3. Percentage of biomarker types used to assess the status of European Mediterranean rivers using macro-invertebrates and fish as bio-indicators.

Ejemplos



EFFECTOS GENOTÓXICOS



Alteración en la integridad del ADN

▷ Ensayo cometa: electroforesis en gel de células individuales.

→ Especificidad

▷ Micronúcleos

▷ Anomalías nucleares en las pruebas de células sanguíneas

Cuadro más completo de los efectos genotóxicos en los individuos

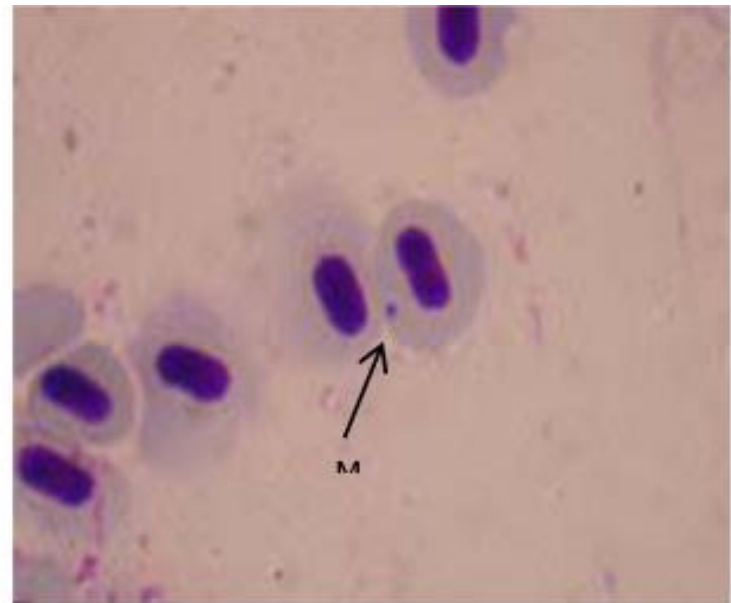
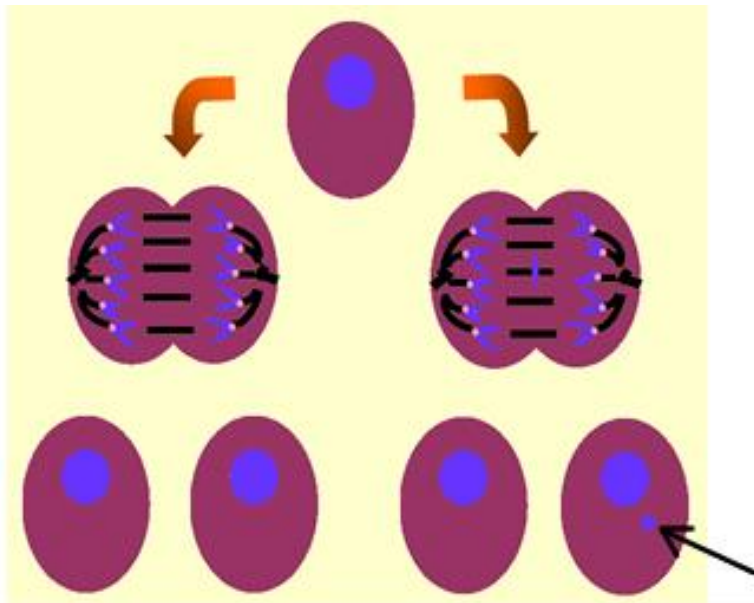
Relevancia ecológica:
Daño extendido a través de generaciones




(Frenzilli *et al.*, 2009)

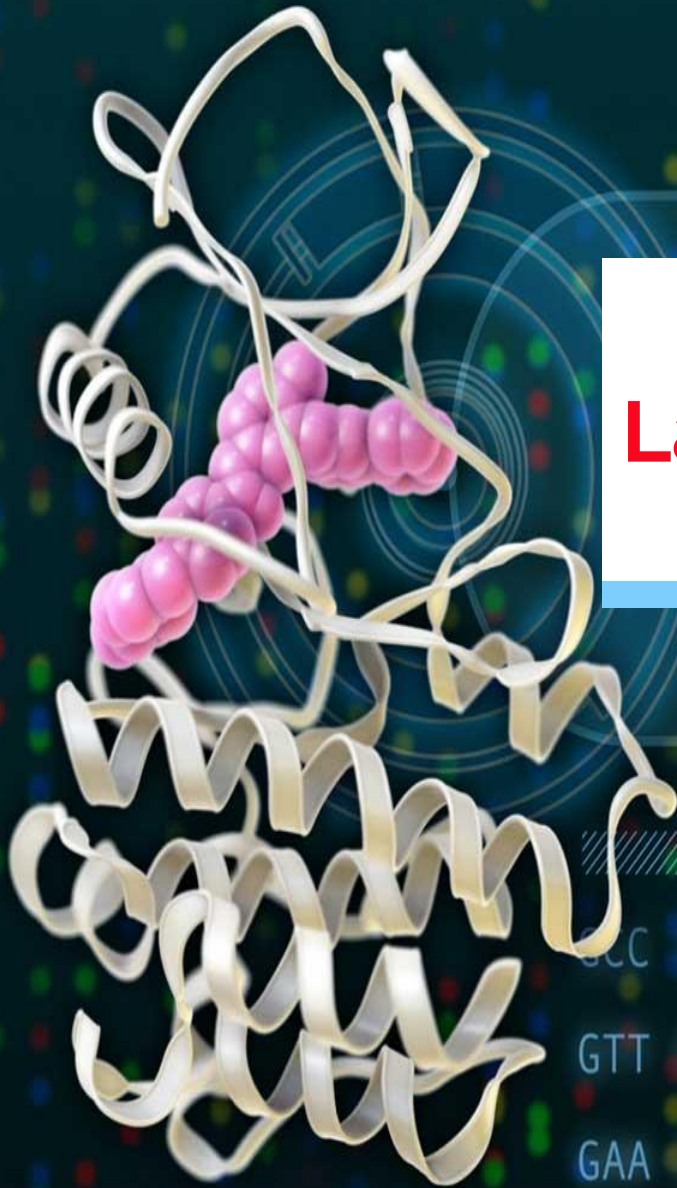


(*Squalius sp.*)



 Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros que quedan fuera del núcleo cuando la célula realiza la mitosis. Esto es la consecuencia de daño a los cromosomas

Tomado de: Genotox bioensayos



La genética y la era de omics



GCC TGC ACT ATC GTT GAG GAA GCC TGC ACT ATC

GTT GAG GAG GCC TGC ACT ATC GTT GAG GTT ACT

GAA CGT GCC TGC ACT ATC GTT GAG ATC ATT AAT

ATC AAT ACT GAA ACT GCT ATT AAT ATC AAT ACT

GAA CGT GCC TGC ACT ATC GTT GAG GAA TGC ACT

Técnicas ómicas, un área de investigación moderna que intenta entender cómo:

los genes expresados (transcriptómicos)

proteínas (proteómica)

metabolitos (metabolómica)

Son alterados por los factores estresantes

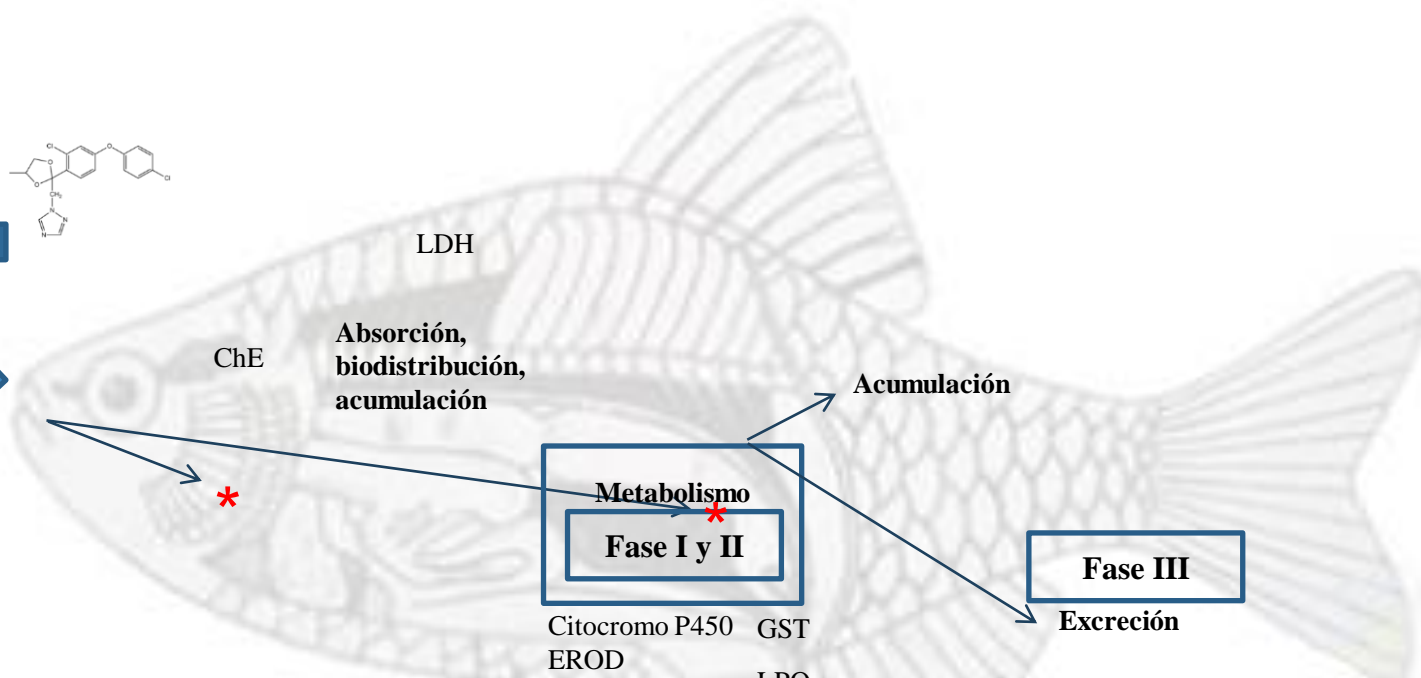
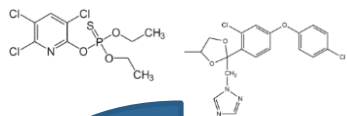
Imagen más comprensiva de los mecanismos de toxicidad y conducir al desarrollo de modelos predictivos



Cyprinus carpio

Respuestas al estrés enzimático y oxidativo





Metabolismo
Fase I y II

Citocromo P450
 EROD
 CAT
 GST
 LPO

Fase III
Excreción

EROD
 Sensible
 Reacciones
 oxidativas

CAT
 Reducción
 H_2O_2 to H_2O

GST
 Conjugación

LPO
 Radicales libres y
 reacciones con
 lípidos de
 membrana

LDH
 Metabolismo
 energético
 anaerobio

ChE




EROD

 **Citocromo P450**

(Peters et al. 1994)



CAT, GST, LPO

 **Estrés oxidativo**

*Aebi et al., (1974), Habing et al., (1976),
Ohkawa et al., (1979).*




ChE

 **Neurotoxicidad**

Ellman (1961)



LDH

 **Costo energético**

Vassault (1983)



Acetil colinesterasa (AChE)

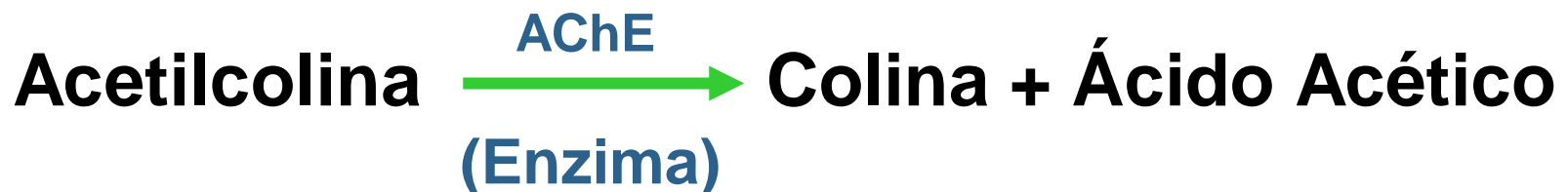
- Inhibición relacionada con efecto tóxico de insecticidas organofosforados y carbamatos
- Inhib por OPs irrev, por Carbamatos es reversible
- Medición en cerebro (sitio de acción de plaguicidas) menos variable que en plasma



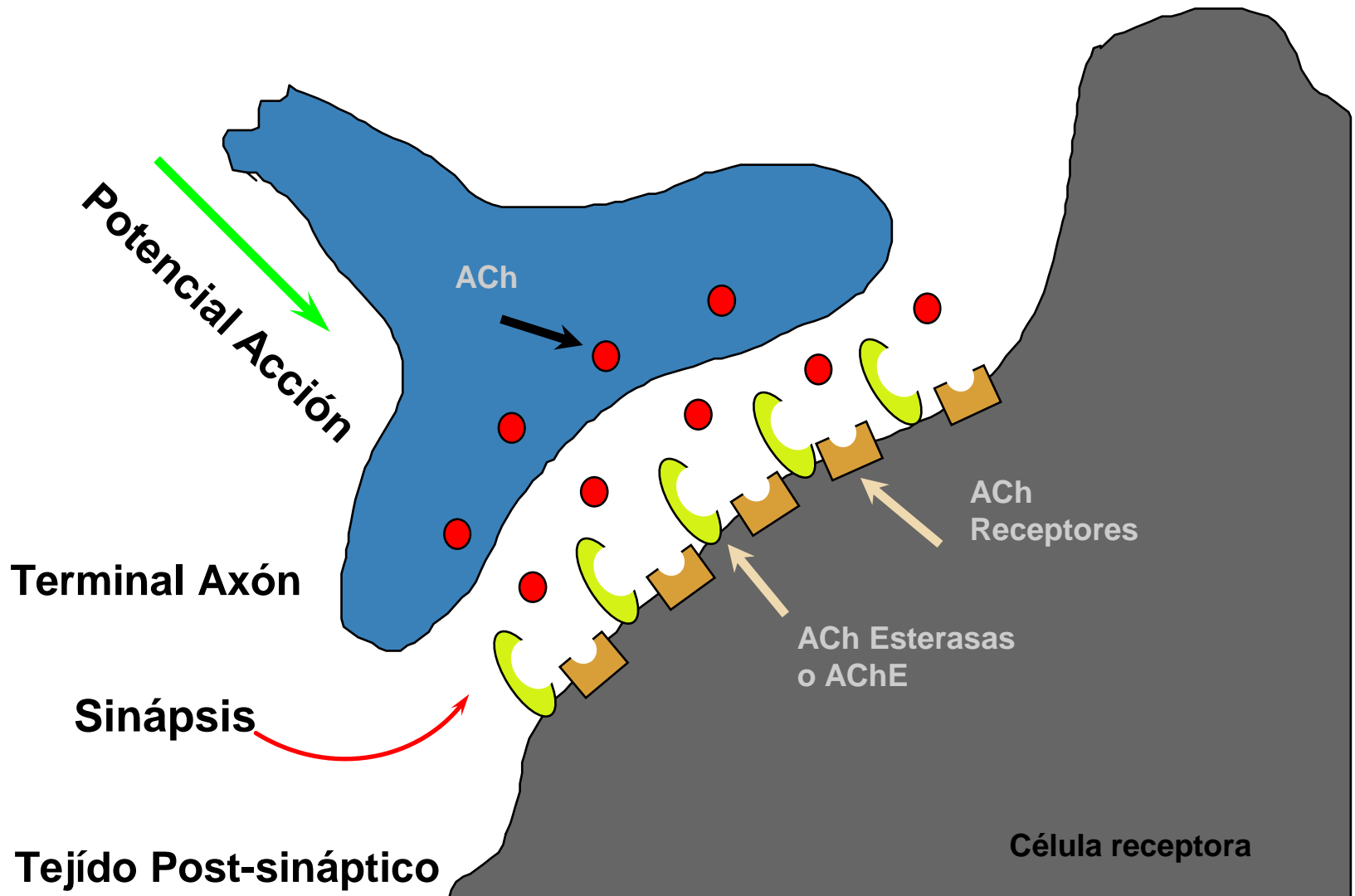
Esterasas B (Inhibidos por OP y carbamatos)

Acetilcolinesterasa (AChE):

- ▷ Altamente específica para la acetilcolina.
- ▷ Esta en células rojas de la sangre, plasma (función desconocida) y en tejido nervioso, localizados en área del cerebro (función degradación/hidrolisis de la acetilcolina liberado en el espacio de la sinapsis durante la transmisión de los impulsos nerviosos)

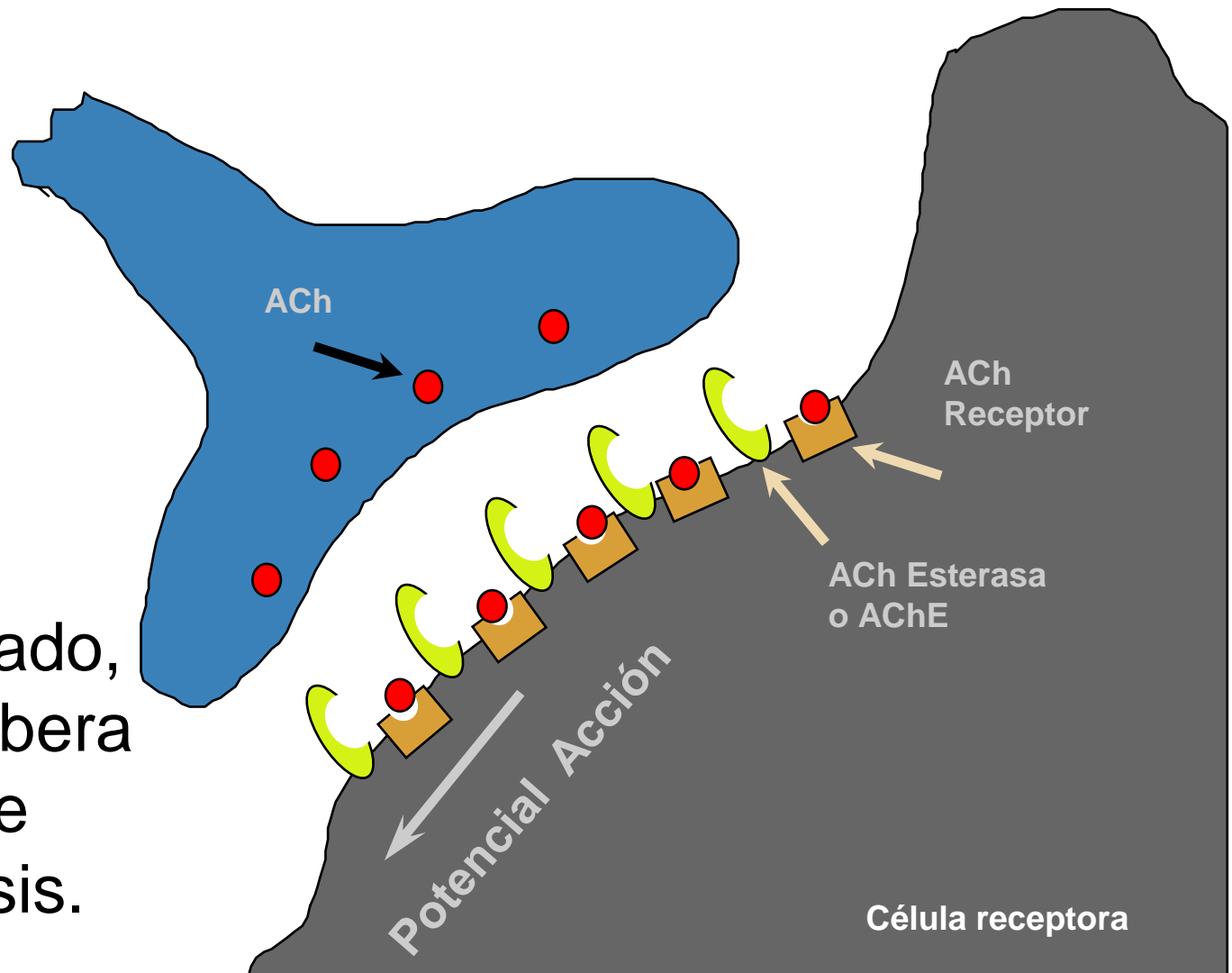


La transmisión sináptica colinérgica ocurre cuando un potencial de acción estimula la liberación de acetilcolina (ACh) en la sinapsis

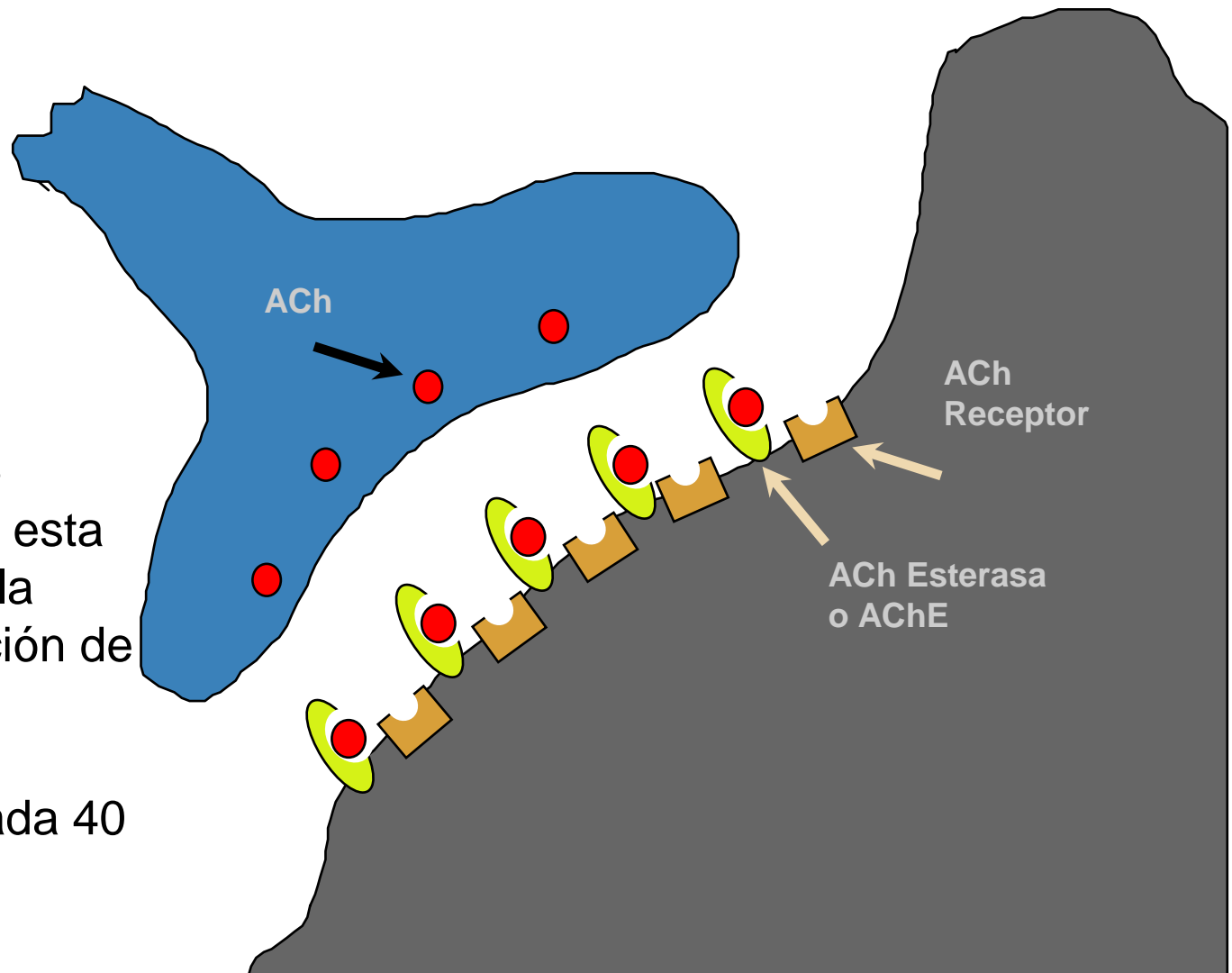


La acetilcolina se une transitoriamente a los receptores, iniciando un nuevo potencial de acción en la célula receptora

Una vez ligado, la ACh se libera nuevamente en la sinapsis.



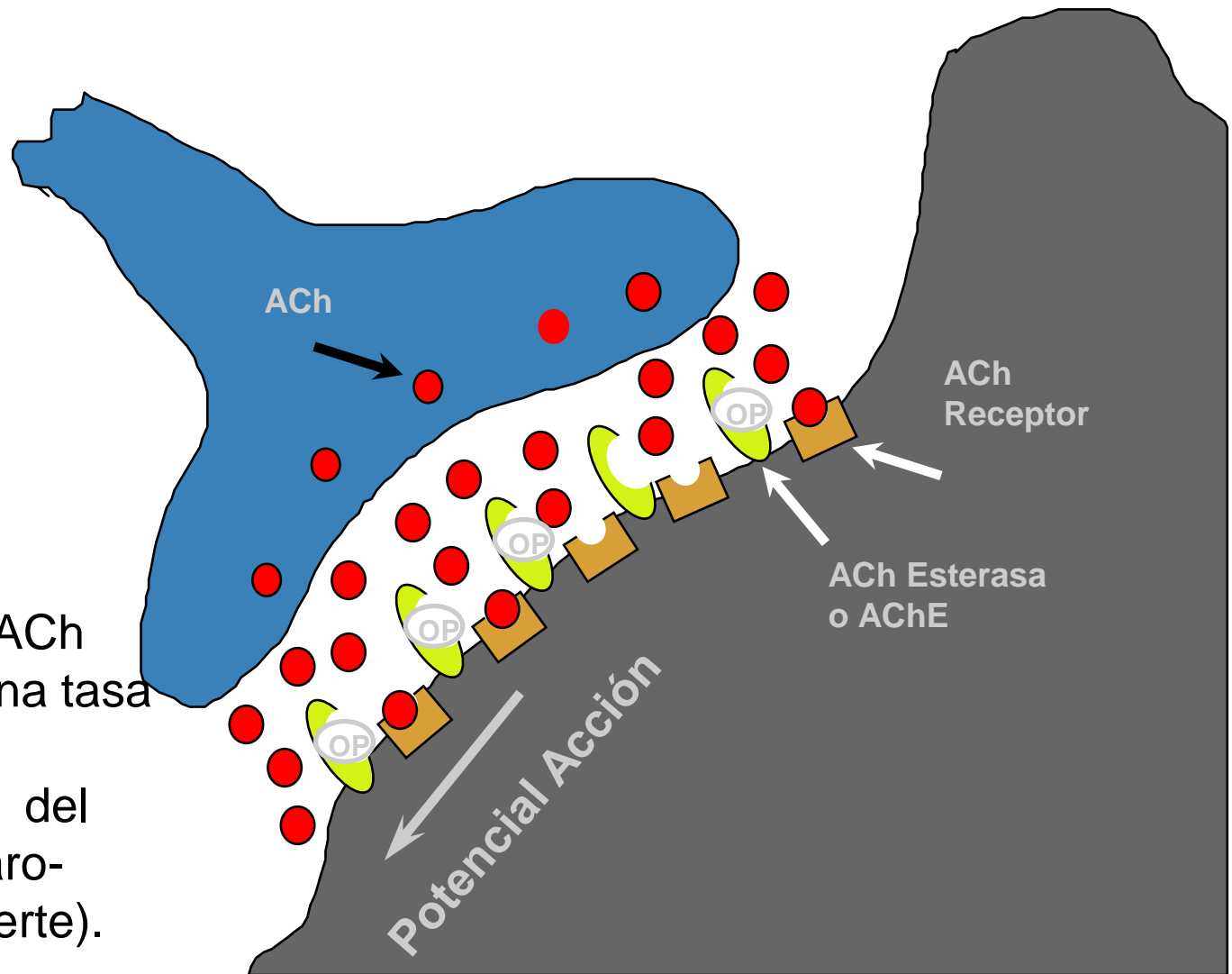
La acetilcolina liberada es rápidamente ligada e hidrolizada (destruido) por AChE.



Una vez libre de ACh, la sinápsis está preparada para la siguiente liberación de acetilcolina.
Hidrólisis 25000 molec/seg = 1 cada 40 microseg.

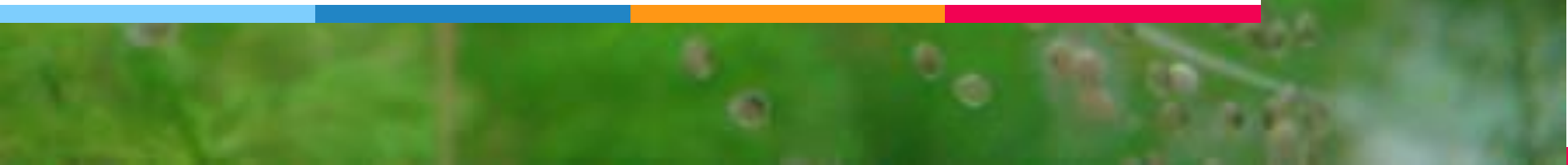
Inhibición de AChE permite la acumulación de grandes cantidades de ACh en la sinapsis

Alta cantidad de ACh puede producir una tasa alta descarga y desensibilización del tejido (tetania, paro-respiratorio y muerte).






Disrupción endocrina



Afectan al crecimiento, desarrollo y reproducción (interferencia en receptores hormonales)



Caso de estudio: Vitelogenina (Martínez et al., 2013)



Estrogénicos (unión a receptor de estrógeno, estimulación de transcripción de procesos estrogénicos)

Antiestrogénicos (unión y bloqueo de receptores de estrógeno)



Indicadores de metabolismo energético y trazadores tróficos

Desequilibrio energético

Disminución de la ingesta



Hacer frente a los trastornos metabólicos causados por estos factores de estrés

Reducción de crecimiento, longevidad, fecundidad y aumento de susceptibilidad a enfermedades.

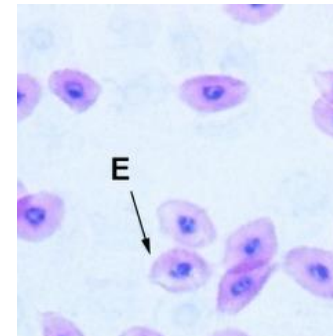
Biomarcadores de alta relevancia ecológica, pero con baja especificidad (Barata et al., 2004)

Análisis tradicionales de la dieta, índices de la condición corporal (Benejam et al., 2009)

Impactos multitróficos

Ácidos grasos (Napolitano, 1999)

Niveles de hematocrito (HCT) y de hemoglobina (Hb) (Maceda-Veiga et al., 2015)



Cascada de alteraciones metabólicas

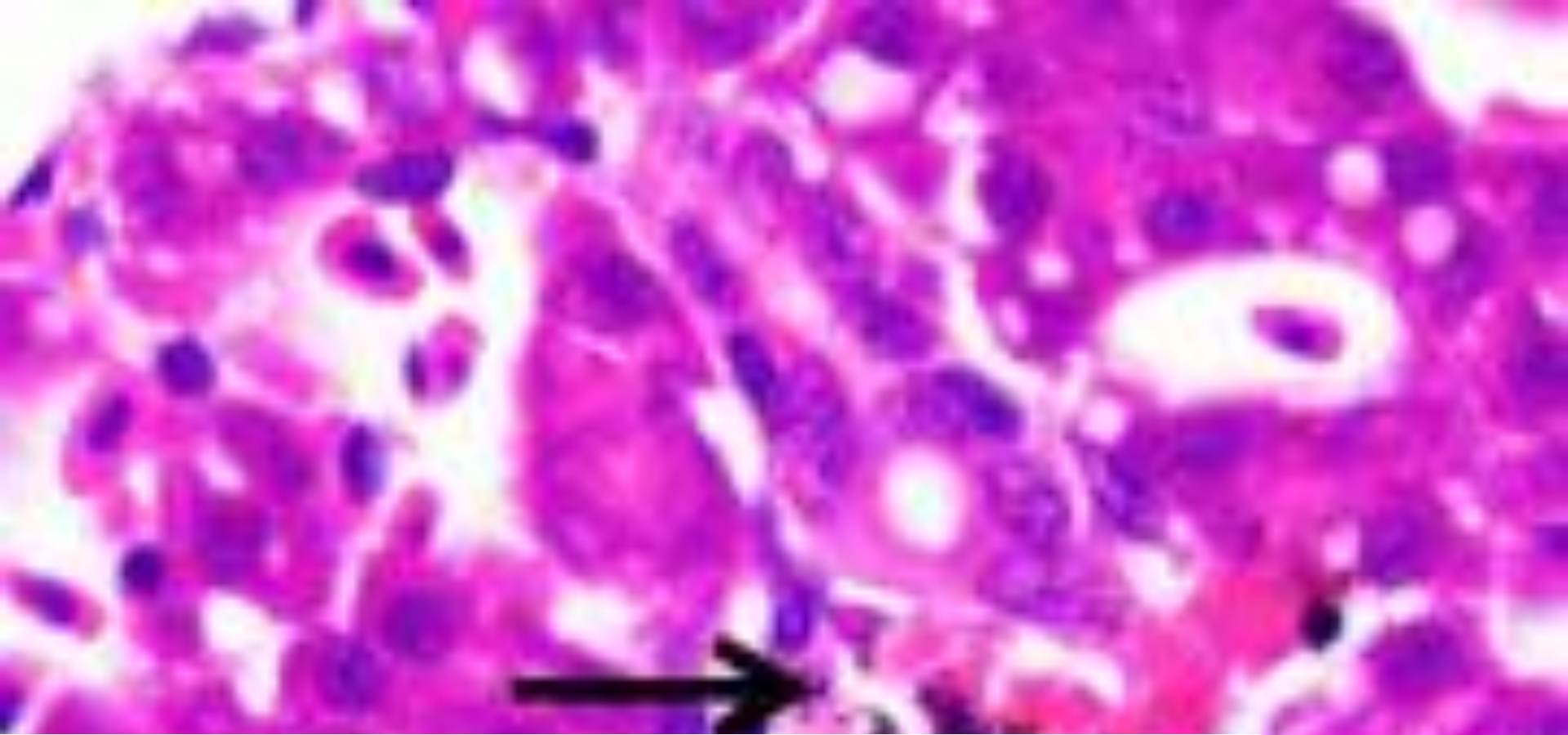
Recuentos relativos de todos los tipos de glóbulos blancos

Cortisol

Enzimas digestivas

Metabolitos de la bilis

(Wikelski a Cooke, 2006, Maceda-Veiga et al., 2013)



Alteraciones histopatológicas

Células y arquitectura de tejidos enteros

Subjetivo-Guías

Herramienta diagnóstica práctica y sensible para evaluar

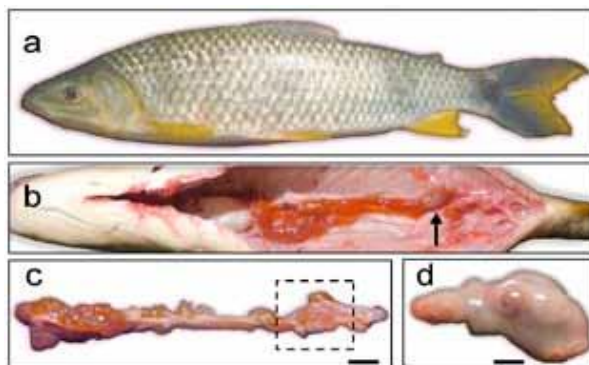
Evaluar varios sistemas de un mismo individuo

Conocimiento anatómico, histológico y fisiológico de las especies objetivo

Deposición de grasa hepática, variaciones naturales (Handy *et al.*, 2002)

Alteraciones particulares asociadas con eventos de contaminación, alta relevancia ecológica

Técnicas de tinción



Domitrovic et al., 2015

Tejido reproductivo
Mantenimiento de la población
Conocer ciclo reproductivo

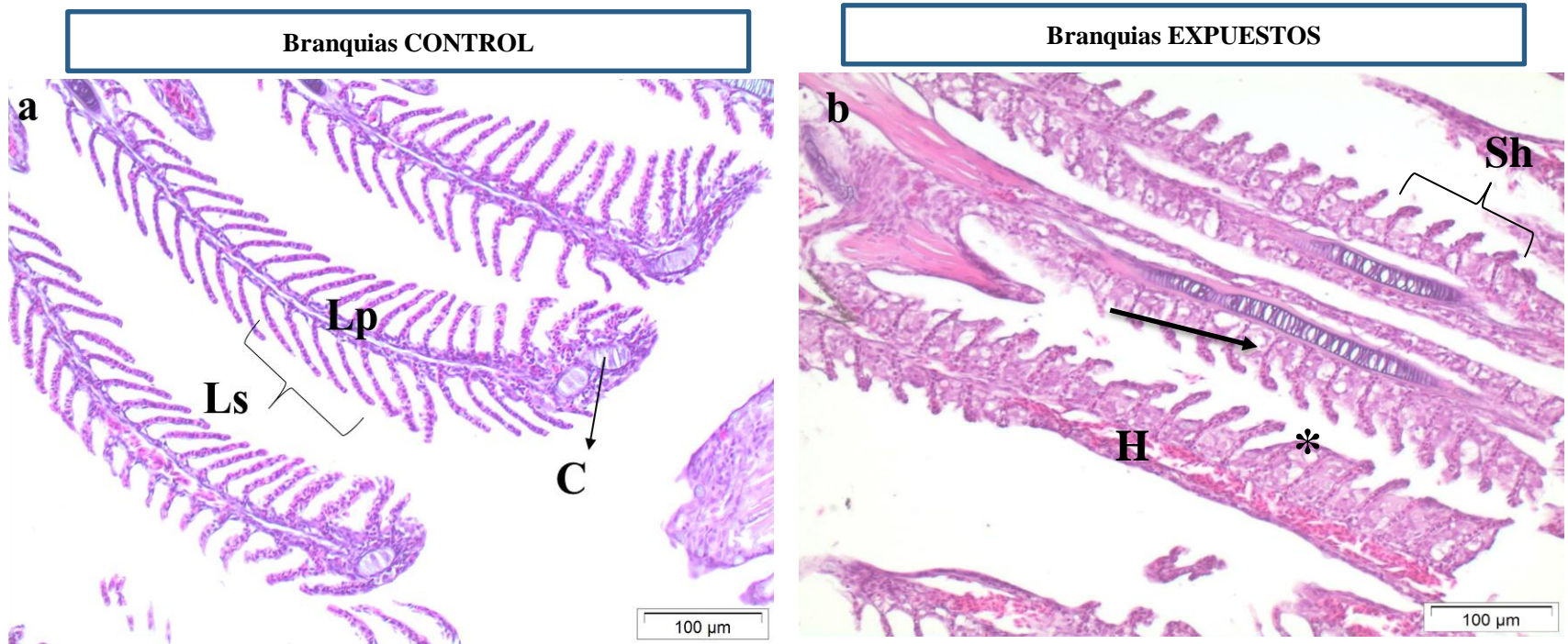
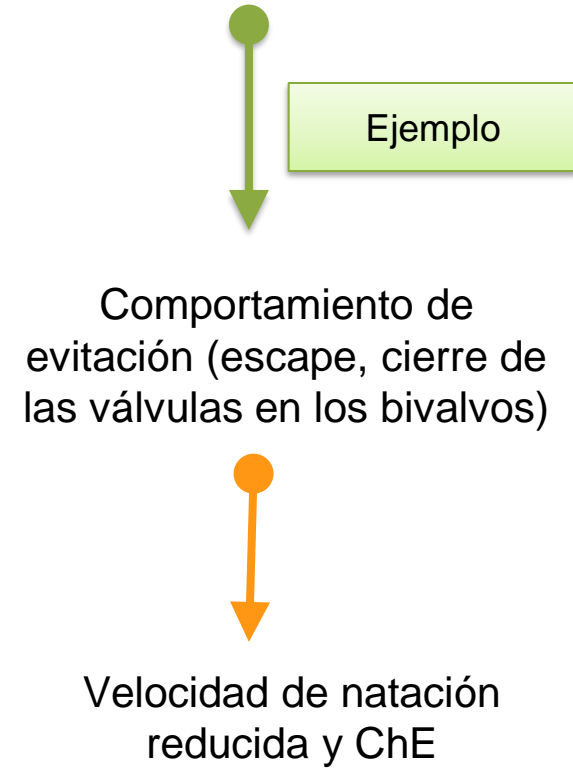
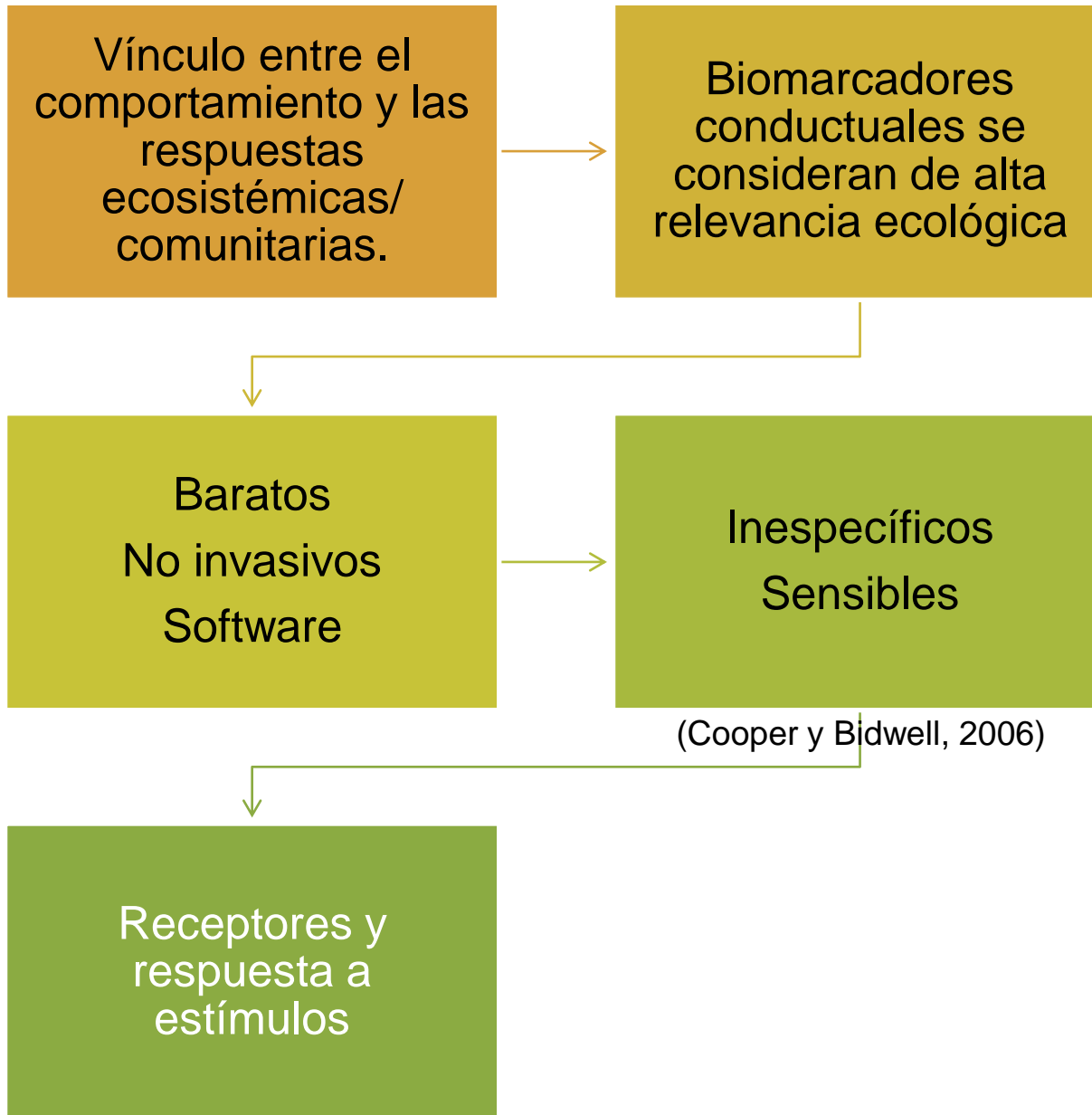


Figura 7. Cortes transversales de branquias de *P. dovii* después de la exposición a CPF (5.5 µg/L) + DFZ (325 µg/L) por 14 días. Estructura normal de branquias (A), se muestra cartílago (C) lamella primaria (Lp) y secundaria (Ls) sin lesiones. Estructuras branquiales con alteraciones histopatológicas (B): Hiperemia (Hp), fusion de laminillas (*); infiltraciones celulares (flecha) y acortamiento (Sh).

Resultados



Rasgos conductuales y fisiológicos



Ecophysiology, ecotoxicology and somewhere in between

Amparo Torreblanca

"La fisiología estudia el funcionamiento de un organismo vivo y cómo ese organismo vivo se ajusta a las adversidades del ambiente"

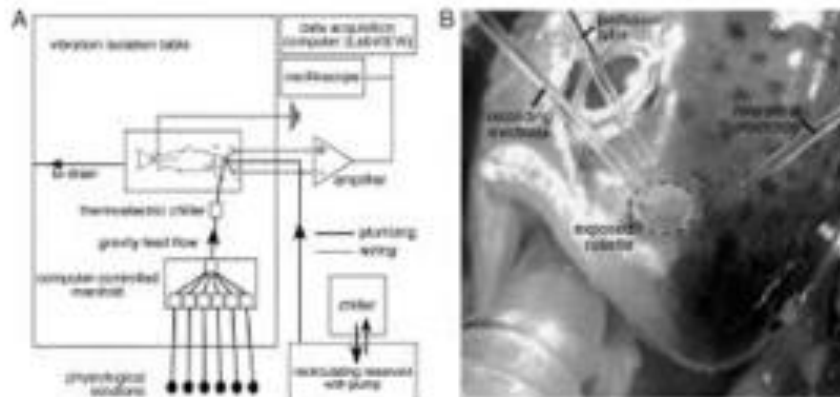
"La ecofisiología estudia cómo el ambiente (físico y biológico) interactúa con la fisiología de un organismo"

Diferentes fuentes de estrés ambiental se reflejarán en la fisiología de los organismos



Respirometría

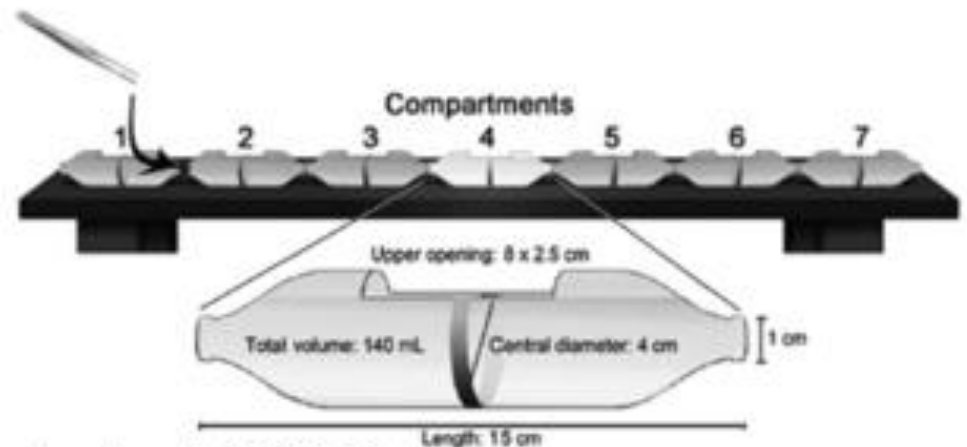
Percepción - Evasión



Baldwin et al 2003 ETnC

EOG - Percepción

Reconocimiento de concentraciones estresantes y evasión



Araújo et al 2018 Chemosphere

Los biomarcadores tienen como objetivo proporcionar **información complementaria** a las medidas de la estructura y función de la comunidad en el monitoreo de estudios para **evaluar mejor** cómo los factores de estrés afectan a los ecosistemas.

¿Ecotoxicología?

PROPUESTA:

1. Escenario
químico

2. Comunidad
objetivo

3. Especies clave

4.
Biomarcadores
generales y
específicos

5. Sitios basales
e impactados

6. Estudios
periódicos

Resumen

- Se apoya que los biomarcadores son fundamentales para detectar los efectos tempranos en las poblaciones antes de que un sistema pueda colapsar en un estado del cual la recuperación es difícil.
- Los biomarcadores también parecen fundamentales para perfeccionar los enfoques ecológicos modernos basados en los rasgos de las especies y para evaluar la eficacia de las prácticas de restauración.
- El uso de biomarcadores más medidas de la estructura de la comunidad y la función del ecosistema puede ayudar a entender y predecir mejor las consecuencias ecológicas de múltiples factores de estrés en los ríos mediterráneos



BIOMARCADORES

- Cambio medible
 - Subindividual
 - Exposición / Efecto
 - Defensa / Daño

- Respuestas tempranas
- Especificidad (relación con causa)

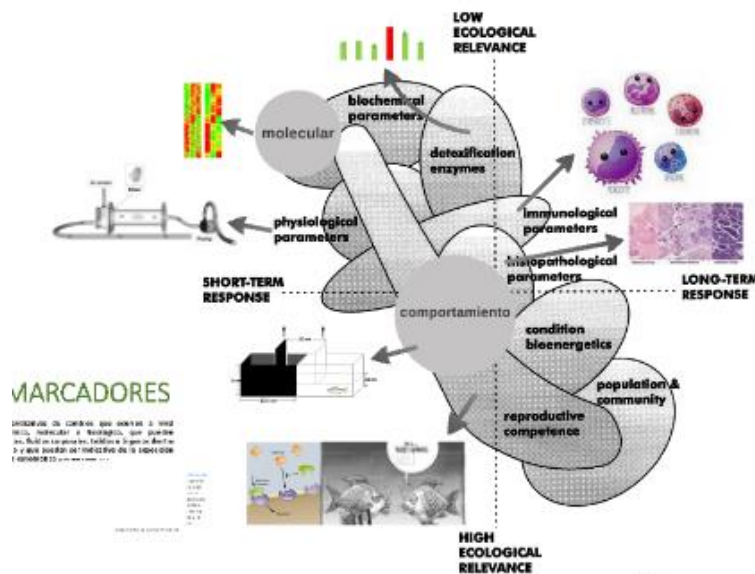
• **Baja relevancia ecológica**

• Relevancia aumenta si se ligan efectos a diferentes niveles de organización

• **Cambios reversibles vs irreversibles**

• **Concepto base de un estado fisiológico "normal"**

• **Biomarcadores = biomonitoreo de bajo costo e incluso sustituto de monitoreo químico**



Biomarcadores en el IRET

- Actividad Colinesterasa (ChE)
- Actividad Glutathion S-transferasa (GST)
- Actividad Catalasa (CAT)
- Actividad LDH
- Actividad EROD
- Peroxidación de lípidos (LPO)
- Estudios a nivel de expresión de CyP1A y VTG (qRT-PCR)
- Estudios de comportamiento
- Estudios histopatológicos

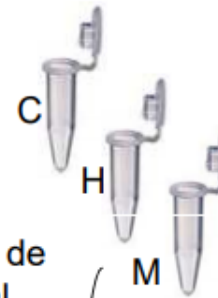


1-Exposición in situ de peces en jaulas por 48 h



48 h después

2-Disección de organismos sobrevivientes en el sitio para toma de muestras para biomarcadores (bioquímicos y moleculares)



2.1-Muestras de cerebro, hígado y músculo para análisis bioquímicos

2.1.1-En Laboratorio:

Muestras almacenadas a -80°C.

- Homogenización y fraccionamiento de la muestra.
- Análisis de Biomarcadores (Colinesterasa, Glutathion S-transferasa, Peroxidación lípídica y Catalasa)

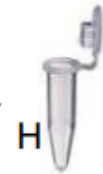


Transporte de muestras al laboratorio en Nitrógeno líquido

2.2-Muestra de hígado para análisis moleculares conservada en RNAlater

2.2.1-En Laboratorio:

- Muestras almacenadas a -80°C
- Cuantificación de mRNAs de vitelogenina y CyP1A por qRT-PCR.



Trabajo con especies nativas



Parachromis dovii



Poecilia gillii



Astyanax aeneus



Atractosteus tropicus

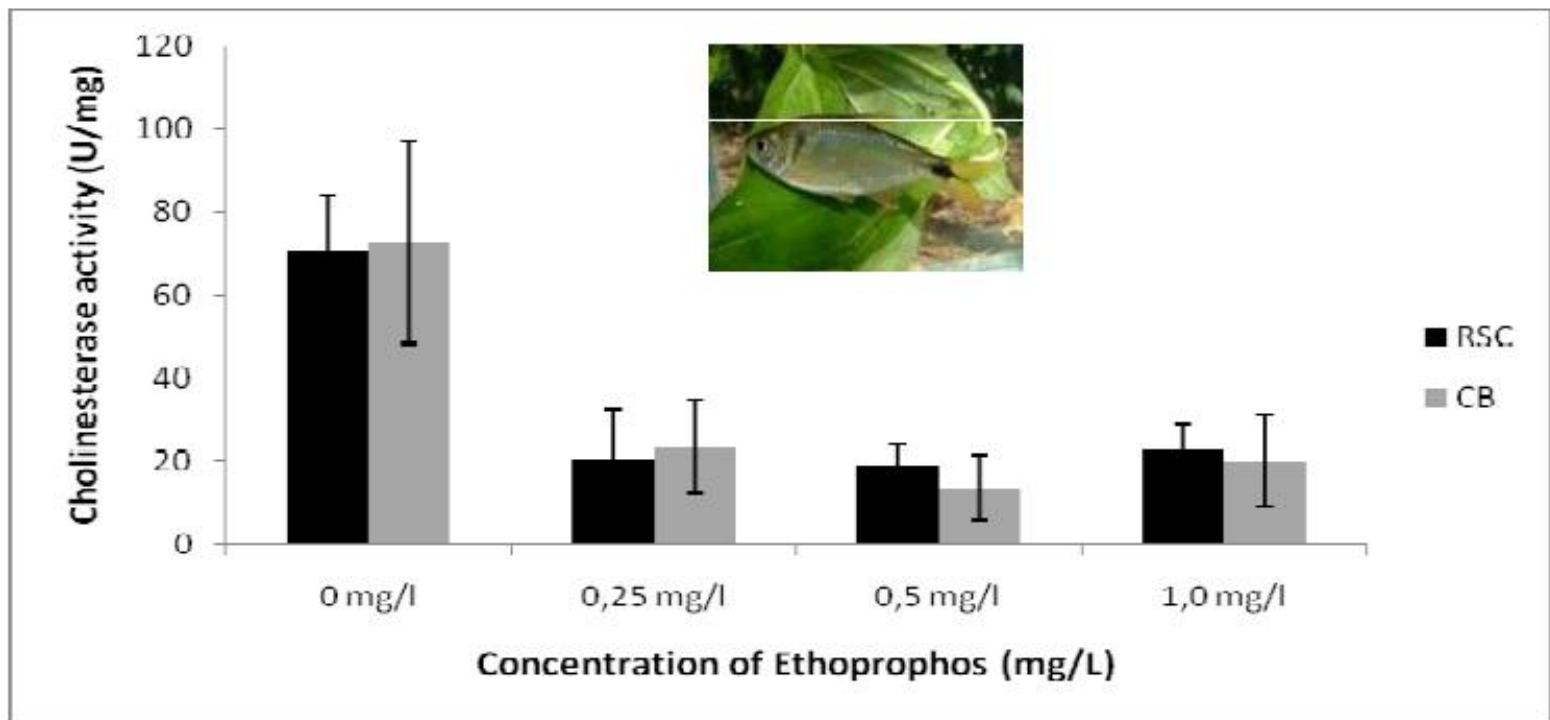


Macrobrachium sp



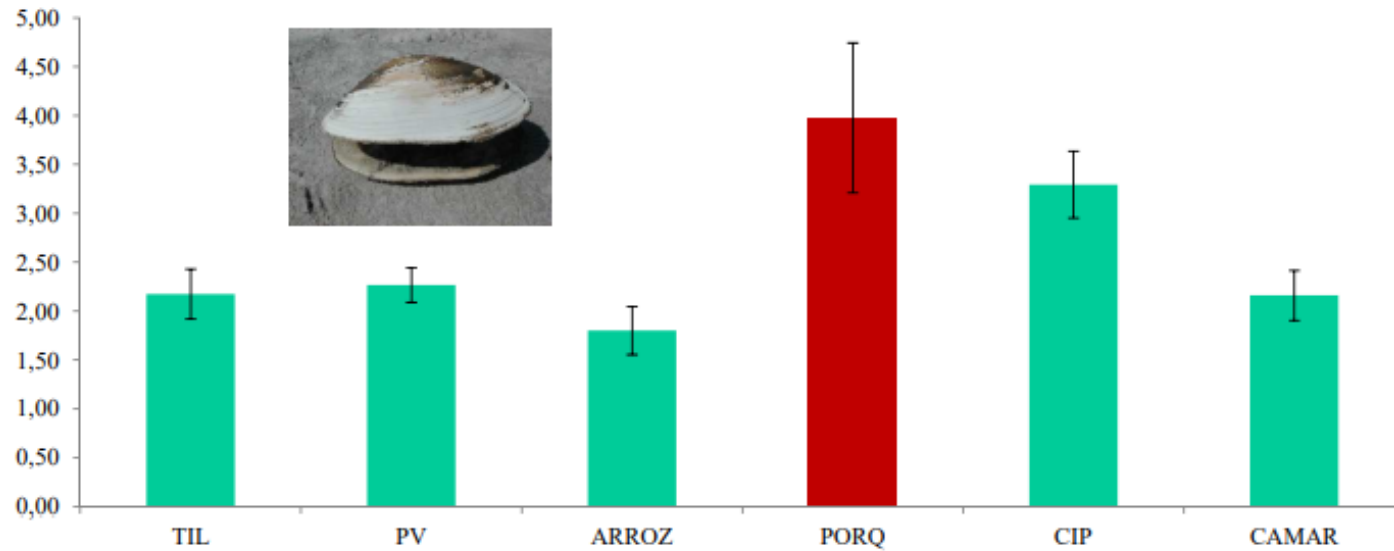
Anodontites luteola

Inhibición de la **ChE** en *Astyanax aeneus* expuesto a Un **Organofosforado**:

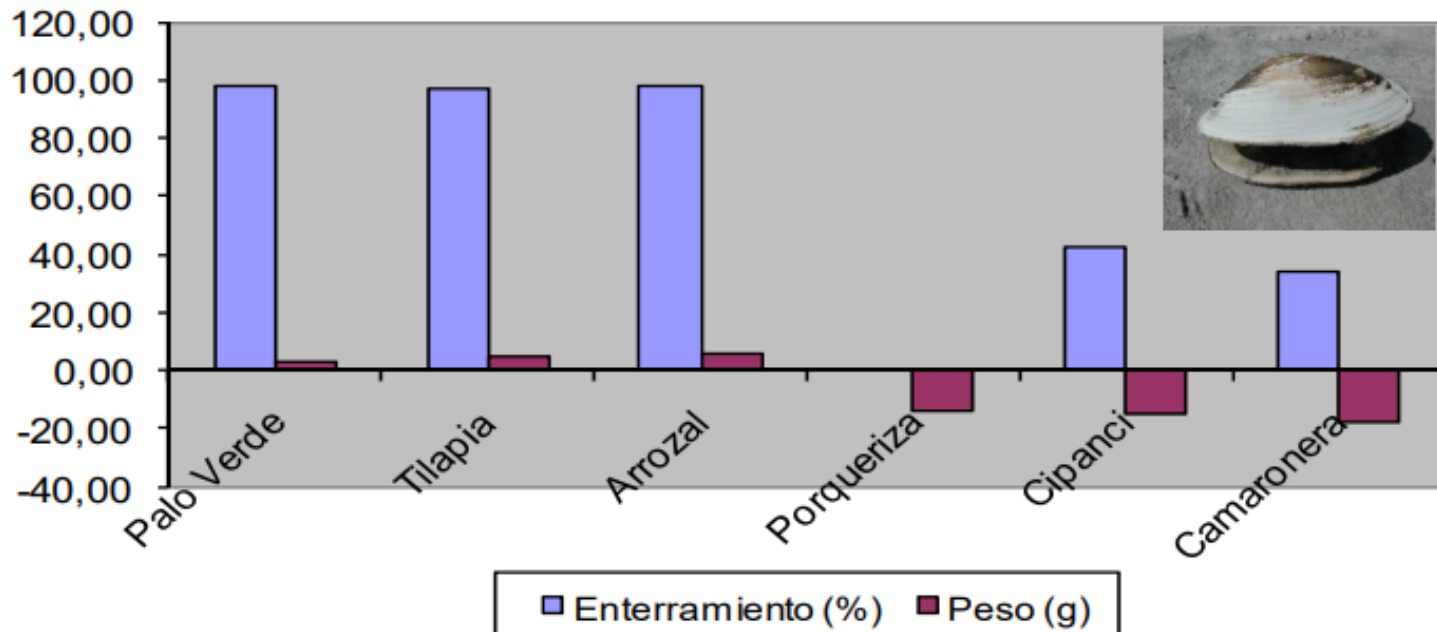


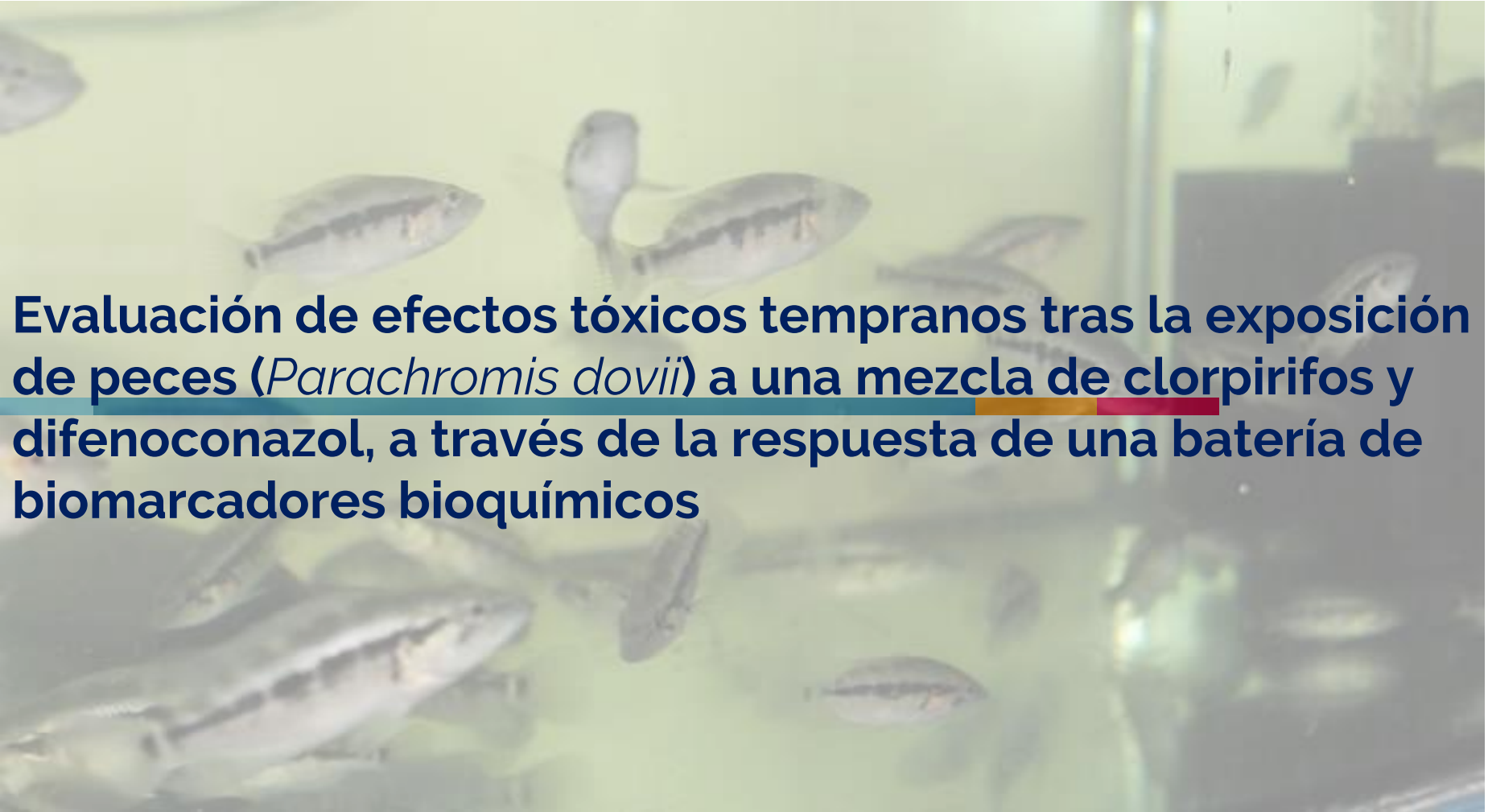
Actividad de la **GST** en *Anodontites luteola* expuesta a **sedimentos** de diferentes sitios:

GST ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprot}^{-1}$) **muestreo mayo 2009**



Evitamiento del sedimento y **Cambio de Peso** en *Anodontites luteola* expuesta a sedimentos de diferentes sitios:





Evaluación de efectos tóxicos tempranos tras la exposición de peces (*Parachromis dovii*) a una mezcla de clorpirifos y difenoconazol, a través de la respuesta de una batería de biomarcadores bioquímicos

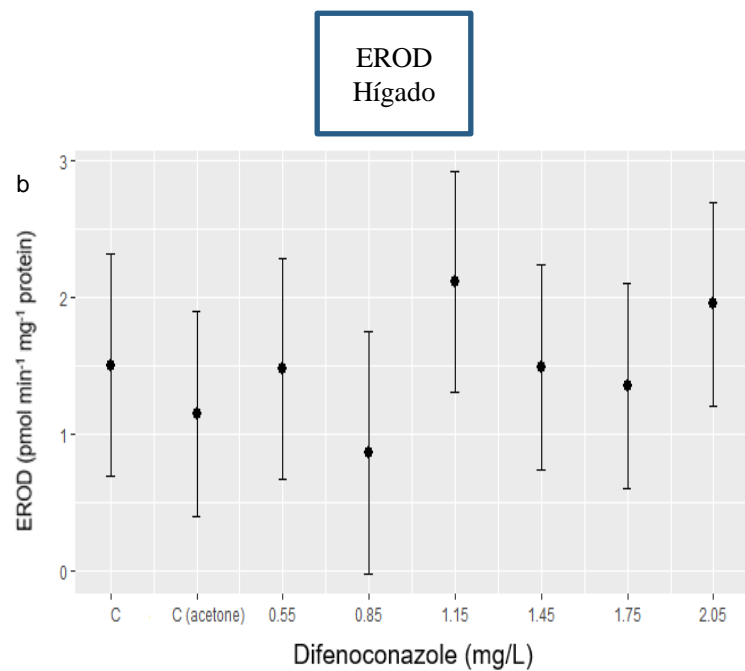
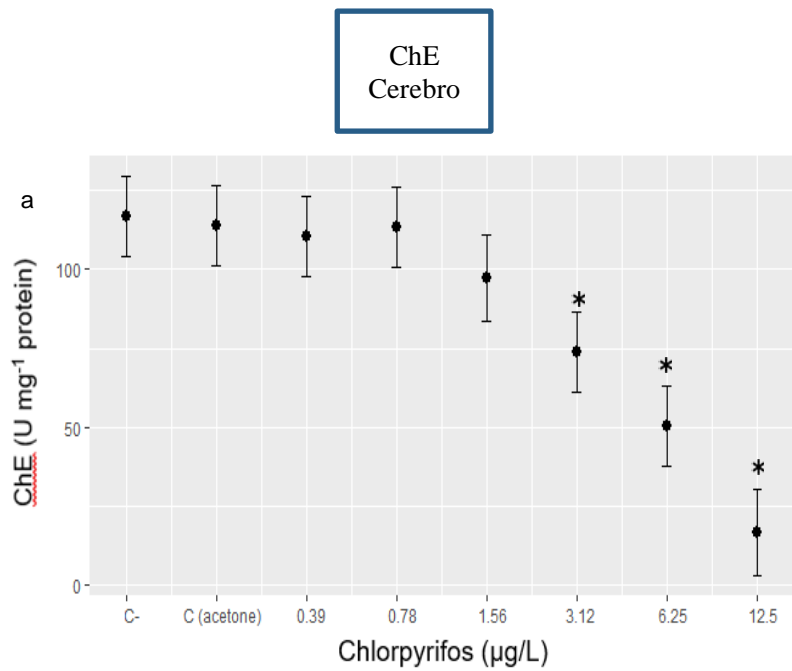
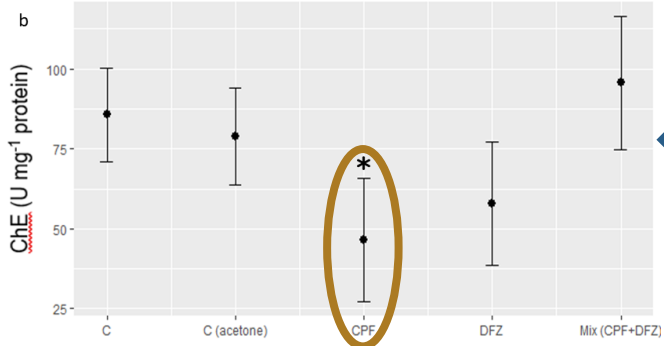
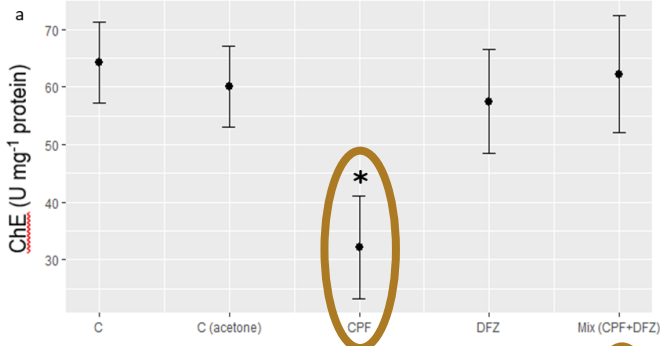


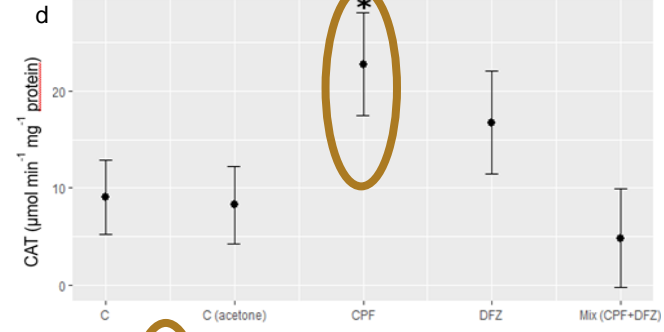
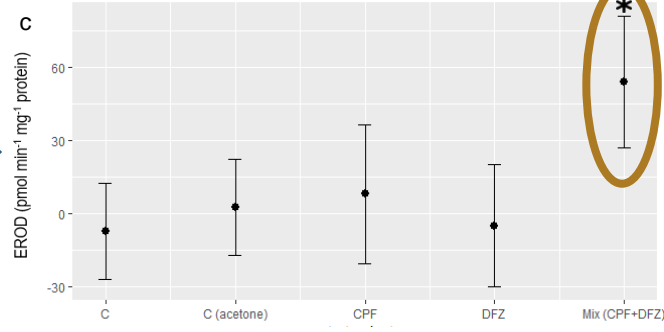
Figura 2. Actividad en cerebro (a) y EROD en hígado (b) de *P. doyii* expuestos a CPF y DFZ respectivamente.

ChE
Cerebro



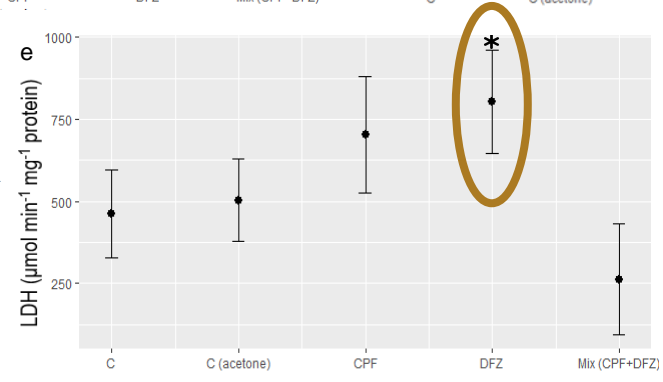
ChE
Músculo

EROD
Hígado



CAT
Branquias

LDH
Músculo





Gracias por su atención



Elabore un cuadro con los documentos compartidos, incluya: las mediciones realizadas (biomarcadores), técnicas que utilizan, que significa la respuesta (interpretación), relación con la ecotoxicología (efectos, contaminantes).

Contacto: kathyjq07@outlook.com