

## COLABORACIONES EN CIENCIAS DE LA NATURALEZA

### LA EVALUACIÓN DE EFECTOS DE LOS CONTAMINANTES EN LOS ECOSISTEMAS: NECESIDADES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

#### LA EVALUACIÓN DE RIESGO AMBIENTAL: ANÁLISIS DE LA EXPOSICIÓN Y DE LOS EFECTOS DE LOS CONTAMINANTES

La Evaluación del Riesgo Ambiental (ERA) es hoy en día la mejor herramienta científico-técnica disponible para el control de la contaminación ambiental. En el ámbito europeo esta herramienta se ha adaptado a los distintos reglamentos o procesos reguladores para la comercialización y utilización de compuestos químicos: reglamento REACH para sustancias químicas industriales y biocidas [1] (ver número 1 (2008) de 100cias@uned, págs. 152-159), reglamento para productos fitosanitarios [2] y guías para fármacos [3,4], adaptándose en cada caso a las necesidades propias de las características y del uso de cada tipo de compuesto. La ERA consiste en el análisis de dos variables que condicionan la probabilidad de un compuesto para ser nocivo cuando es liberado al medio ambiente: el análisis de la exposición y el análisis de los efectos. En el análisis de la exposición es necesario establecer el perfil de distribución entre los distintos compartimentos medioambientales del compuesto, así como el tiempo estimado de permanencia y su concentración. Debido a la complejidad de los procesos de degradación, de disipación y de repartición que un compuesto puede experimentar en el medio se han desarrollado guías para establecer concentraciones estimadas en cada compartimento (PEC - *Predicted Environmental Concentration*), y escenarios de exposición que permiten una simplificación de la realidad. Ello, junto con el gran avance de la Química Ambiental que permite obtenciones de concentraciones medidas reales o MEC (*Measured Environmental Concentration*) a través de la monitorización, constituye la base del análisis de la exposición de un compuesto para su ERA.

En el caso del análisis de los efectos, si no más complejo, sí podría decirse que representa un reto poder establecer una concentración de no efecto o PNEC (*Predicted Non-Effect Concentration*) para cada compartimento ambiental, pues ello dependerá de la sensibilidad de las especies y del ecosistema afectado por el compuesto en cuestión. Si a ello le sumamos que dichos organismos no serán expuestos a un solo compuesto, sino a una mezcla compleja, el análisis adquiere una nueva dimensión, ya que es necesario establecer posibles sinergismos, antagonismos o simplemente efectos aditivos de la mezcla de compuestos.

Una ERA es en definitiva una comparación entre la PEC y la PNEC, no existiendo riesgo para el medio ambiente siempre y cuando la PEC no supere la PNEC.

#### ECOTOXICOLOGÍA: EL ANÁLISIS DE EFECTOS

La Ecotoxicología es la rama de la Toxicología Ambiental que estudia los efectos de las sustancias químicas sobre los ecosistemas [5], y por tanto proporciona las metodologías necesarias para el análisis de efectos. El desarrollo de estas metodologías ha obedecido a los distintos problemas que han ido surgiendo a la hora de evaluar el riesgo de sustancias nuevas o existentes, así como a la necesidad de responder a cuestiones relevantes sobre la respuesta de los organismos vivos a la contaminación. La primera característica a tener en cuenta en el desarrollo de ensayos ecotoxicológicos es la valoración de efectos agudos o crónicos. La diferencia entre ambos viene dada por el tiempo de exposición al compuesto, siendo corta en el caso de un ensayo agudo y de larga duración en el caso de un ensayo crónico. El uso de un ensayo agudo o crónico dependerá de si es necesario estimar la respuesta de un organismo vivo a corto o largo plazo. La siguiente característica de un ensayo ecotoxicológico es el tipo de respuesta a estudiar o *endpoint*, que abarca un amplio espectro de tipos de ensayo dependiendo del nivel biológico de respuesta: existen *endpoints* para determinar respuestas a nivel molecular (por ejemplo, actividades enzimáticas, expresión génica,...), a nivel celular (por ejemplo, apoptosis, citólisis,...), a nivel sistémico (por ejemplo, respiración, metabolismo,...). Lo más usual es que todas estas respuestas



Figura 1. Esquema del proceso de Evaluación de Riesgo Ambiental. Fuente: U.S. EPA-Environmental Protection Agency (1998).

se produzcan en cascada, pudiendo desembocar en efectos ecológicamente relevantes como afectar a la supervivencia, el crecimiento y la reproducción, que en definitiva son los parámetros que nos permitirán dilucidar si la exposición compromete la supervivencia de la población. La determinación de estos últimos parámetros ecológicamente relevantes suelen ser los requeridos en las guías de ensayo estandarizadas por organismos internacionales, como la OCDE, que incluye en la Sección 2ª “sobre efectos en sistemas biológicos” cuarenta y cinco guías para plantas, algas, invertebrados acuáticos y terrestres, y vertebrados acuáticos. Las dos últimas guías adoptadas [6,7] se han desarrollado para estos últimos, en las que se incluye un ensayo de una generación (pe-

ces) y un ensayo sobre crecimiento y desarrollo (anfibios).

En todos los ensayos anteriores se trabaja con una única especie por ensayo. Sin embargo, se han desarrollado metodologías para estudiar los efectos simultáneamente en varias especies, son los llamados ensayos multi-especies, microcosmos, mesocosmos y estudios de semi-campo. Este tipo de ensayos aportan información más allá de la respuesta del individuo y se diseñan para valorar efectos a nivel población o incluso a nivel comunidad. Aunque pueden existir guías para el diseño de estos últimos ensayos, especialmente las correspondientes a productos fitosanitarios [8], suelen ser diseños únicos en los que se buscan respuestas específicas, como la alteración de relaciones interespecíficas del tipo depre-



Figura 2. Existen tres agencias europeas encargadas de la evaluación del riesgo ambiental de productos químicos y biocidas (ECHA-European Chemicals Agency: [www.echa.europa.eu](http://www.echa.europa.eu)), productos fitosanitarios (EFSA-European Food Safety Authority: [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu)) y fármacos (EMA-European Medicines Agency: [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

dación, o competencia por una misma fuente de alimento, incluso la valoración de la exposición a través de la cadena trófica. En definitiva, permiten observar la alteración de la estructura y el funcionamiento del sistema de ensayo en el que se han ensamblado varias especies artificial o naturalmente. A medida que aumenta la complejidad del ensayo aumentan la fiabilidad y realismo de la repuesta aportada, pero también aumenta la dificultad de interpretación de los datos del ensayo, así como el coste y la laboriosidad del mismo. Por ello el análisis de efectos se realiza utilizando todas las metodologías ecotoxicológicas disponibles según su relación coste/beneficio. De este modo el análisis suele realizarse por niveles de complejidad, comenzando por aquellos ensayos rápidos y sencillos que nos dan una información sobre el mecanismo de acción de la sustancia, para ir subiendo en complejidad a medida que disminuye nuestra incertidumbre sobre sus posibles efectos en el medio ambiente.

Un aspecto importante a considerar en el análisis de efectos es la diferente sensibilidad de respuesta entre es-

pecies. Para cubrir este aspecto debe conocerse la respuesta de varias especies con el fin de obtener información sobre cuán diferente es la sensibilidad. La especie más sensible determinará el cálculo de la PNEC. Existen dos aproximaciones para el cálculo de la PNEC que dependerá del número de especies estudiadas. Cuando dispongamos de datos de unas pocas especies utilizaremos el llamado método determinista que consiste en utilizar el dato de la especie más sensible y aplicarle un factor de seguridad. El método probabilístico se utiliza cuando disponemos de un gran número de datos de ensayos ecotoxicológicos con distintas especies pudiéndose obtener lo que se conoce como “curva de sensibilidad de especies”, en este caso la PNEC viene determinada como el percentil 5 ó 10 de dicha curva. En cualquiera de los dos casos las especies utilizadas deberán ser representativas de los distintos eslabones de la cadena trófica y de los distintos compartimentos ambientales. Por ejemplo, en el caso del medio acuático deberíamos tener datos de toxicidad de al menos una especie de productores prima-



Figura 3. La Ecotoxicología es una disciplina que integra conocimientos de la Química Ambiental, la Toxicología y de la Ecología, y que tiene como objetivo señalar, analizar y predecir problemas medioambientales. Además, una característica a destacar es la posibilidad de trabajar a diferentes niveles de organización biológica mediante metodologías que permiten valorar efectos desde nivel individuo hasta efectos en la estructura y función de los ecosistemas.

rios (algas), consumidores primarios (invertebrados) y consumidores secundarios (peces). Asimismo, tendremos datos de al menos una especie del compartimento agua y del compartimento sedimento, con el fin de cubrir exposiciones a través de la columna de agua y a través del sedimento (organismos bentónicos).

Tradicionalmente con los datos que proporciona un ensayo ecotoxicológico se construyen curvas dosis-respuesta. Estas curvas son *a priori* curvas de respuesta lineal que permiten el cálculo de la EC50 (*Effect concentration 50*) o concentración de efecto para el 50% de la población de individuos utilizados. Dichos efectos pueden ser letales (LC50 - *Lethal concentration 50*) o subletales (crecimiento, reproducción, etc.). Sin embargo, la aparición de compuestos en el medio capaces de producir respuestas no lineales ha puesto sobre la mesa importantes cuestiones que deben ser resueltas. Es el caso de los disruptores endocrinos, compuestos capaces de producir efectos a concentraciones muy bajas que no se dan a concentraciones superiores. Es la conocida como respuesta en forma de U invertida.

## UN ANÁLISIS DE LOS EFECTOS BASADO EN NIVELES DE COMPLEJIDAD: EL EJEMPLO DE LOS DISRUPTORES ENDOCRINOS

Si consideramos la complejidad de los ensayos ecotoxicológicos como una línea continua, en un extremo de la línea estarían los ensayos que se realizan *in vitro* (menos complejos), mientras que en el extremo opuesto estarían los estudios *in situ* de máxima complejidad por realizarse en condiciones ambientales reales. Entre ambos extremos existe una gran variedad de diseños experimentales. La comunidad científica ha reconocido la necesidad de integrar la variedad de ensayos ecotoxicológicos en los protocolos ERA en un esquema que permite ir subiendo en niveles de complejidad. Para ilustrar este método de trabajo nos referiremos al marco teórico de Evaluación de Efectos de Disrupción Endocrina, desarrollado por la OCDE y conocido como EDTA (*Endocrine Disruptor Testing and Assessment*).

Los disruptores endocrinos (EDCs - *Endocrine Disrupting Chemicals*) son compuestos capaces de alterar el balance hormonal y por tanto producir efectos adversos que median a través de mecanismos endocrinos. En las últimas décadas se ha demostrado que muchos EDCs, entre los que existen fármacos, productos fitosanitarios y químicos industriales, pueden afectar al desarrollo, a

la reproducción, al sistema nervioso e inmune, en un gran número de especies [9]. Estas características han convertido a este tipo de compuestos en un caso especial para su ERA.

El marco teórico para la evaluación de efectos de disrupción endocrina [10] contempla cinco niveles de complejidad creciente. A medida que subimos de nivel, la información que el ensayo nos proporciona es de mayor fiabilidad para su utilización con fines reguladores. Hay que tener en cuenta que este esquema no es exclusivo de medio ambiente y está desarrollado también para la protección de la salud humana: en un **primer nivel** se recurriría a toda la información disponible sobre el compuesto, además de toda la que se pueda generar sin realizar ensayos (es la que se genera a partir de QSARs - *Quantitative Structure Activity Relationship* o cualquier otra metodología de estimación teórica). El **segundo nivel** comprende todos los ensayos *in vitro* que permitan identificar el mecanismo de acción para una clasificación preliminar del compuesto como potencialmente disruptor endocrino. Un resultado positivo en este tipo de ensayos advierte de su posible efecto *in vivo*, sin embargo un resultado negativo no excluye la posibilidad de sus efectos *in vivo* pues en estos sistemas *in vitro* el compuesto puede no ser metabolizado completamente, lo que daría lugar a un falso negativo. En un **tercer nivel** se utilizan ensayos *in vivo* que se diseñan específicamente para conocer si el compuesto interacciona con receptores estrogénicos, androgénicos y tiroideos, o si son capaces de interferir en rutas de esteroidogénesis. Este tipo de ensayos son capaces de identificar compuestos con disrupción endocrina y revelan mecanismos de acción, por lo que pueden en determinadas circunstancias servir para la toma de decisiones a nivel de normativa. Sin embargo, como en estos ensayos los organismos no están expuestos durante un periodo relativamente largo de sus ciclos de vida, estos sistemas no son capaces de mostrar todo el posible espectro de sus efectos de disrupción endocrina. El **cuarto nivel** reúne ensayos capaces de detectar uno o más efectos de disrupción endocrina; es decir, suelen valorarse varios *endpoints* y la interpretación de resultados puede no ser concluyente sobre el efecto de disrupción endocrina. Incluso la no aparición de efectos en este tipo de ensayos no significa que el compuesto no tenga propiedades de disrupción endocrina, las cuales pueden no haberse detectado. En este tipo de ensayos podríamos estar valorando efectos relacionados con la disrupción endocrina

(por ejemplo, crecimiento y tiempo hasta la madurez sexual) pero es necesaria más información para poder discriminar si los efectos son mediados específicamente por disrupción endocrina o son causa de una respuesta genérica de toxicidad. Y por último, en el quinto nivel recurriríamos a ensayos para valorar desarrollo o reproducción durante un ciclo de vida parcial o completo (por ejemplo, valoración de malformación de órganos de la reproducción en un ensayo de ciclo de vida completo). La información que proporcionan estos ensayos es de máxima fiabilidad para la ERA de disruptores endocrinos.

El reto es conseguir un esquema general de evaluación de riesgo para el medio ambiente similar al anterior, que permita una valoración de los efectos de un compuesto de acuerdo a su mecanismo de acción. Hasta ahora se ha trabajado de manera exhaustiva con compuestos como los EDCs y los compuestos carcinogénicos.

Poder extender este esquema de evaluación a todos los contaminantes requiere trabajar con un gran número de compuestos, con distinto mecanismo de acción, y una batería de ensayos que entrecruzen respuestas celulares/moleculares con efectos ecológicamente relevantes, como son desarrollo y reproducción, que en definitiva son las respuestas que pueden comprometer la supervivencia de una población.

### EL RIESGO DE TRANSMITIR LOS EFECTOS A LAS SIGUIENTE GENERACIONES: GENOTOXICIDAD Y EPIGENÉTICA

Una población puede verse afectada por efectos latentes que no se expresan sino es a través de generaciones. Estos efectos latentes son los que tienen que ver con alteraciones genéticas que son el objeto de estudio de la Ecogenotoxicología o “estudio de cambios en el material

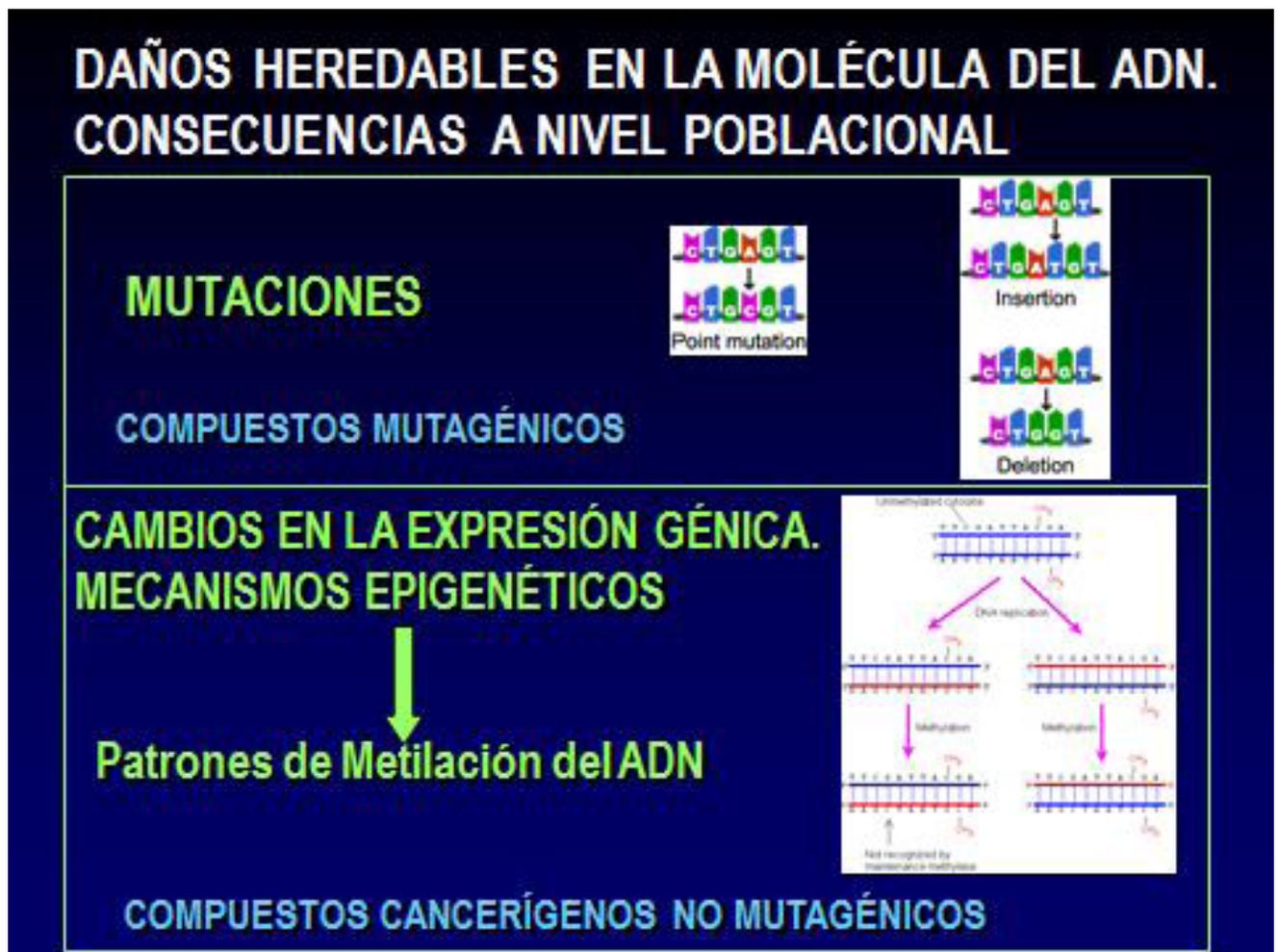


Figura 4. Uno de los efectos observables a largo plazo que preocupan desde un punto de vista ecotoxicológico son aquellos que puedan ser provocados por compuestos capaces de producir alteraciones heredables como pueden ser las mutaciones (compuestos mutagénicos) o afectar mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN (compuestos cancerígenos no mutagénicos).

genético de la biota inducidos por compuestos químicos o radiaciones” [11]. Los compuestos genotóxicos son aquellos capaces de producir un daño a nivel del ADN. Se han desarrollado ensayos para detectar este tipo de compuestos a varios niveles de organización biológica. Existen técnicas moleculares para la detección de aductos del ADN (por ejemplo, técnica de postmarcaje con P<sup>32</sup>), o rotura de hebras de la molécula de ADN (por ejemplo, ensayo cometa). También se han desarrollado técnicas para valorar efectos a nivel celular que se conocen como ensayos de citogenotoxicidad (por ejemplo, ensayo de intercambio entre cromátidas hermanas, ensayo de aberraciones cromosómicas y ensayo de micronúcleos). Aunque estos ensayos permiten detectar posibles daños genéticos, lo verdaderamente relevante, desde un punto de vista ecotoxicológico, son los efectos que los compuestos genotóxicos pueden provocar a nivel poblacional mediante la transmisión de efectos heredables, es decir, daños que afectarán a los gametos y que pasarán a la siguiente generación. El mecanismo tradicionalmente conocido por el que un compuesto puede dar lugar a un daño transmisible es la mutación. Ésta se produce por causa de una reacción directa del compuesto con la molécula del ADN. Los compuestos que producen este tipo de daños se conocen como compuestos mutagénicos. Sin embargo, existen otro tipo de compuestos no mutagénicos, que han producido grandes controversias sobre todo en el ámbito de la Toxicología por ser no mutagénicos y sin embargo inducir procesos tumorales. Recientemente, este tipo de compuestos se consideran capaces de actuar sobre los mecanismos epigenéticos celulares. Existen distintos tipos de mecanismos epigenéticos a través de los cuales se regula la expresión génica, la metilación de citosinas del ADN es el más estudiado. Este mecanismo actúa a través de la existencia de unas islas CG (citosina/guanina) cercanas a los promotores, cuando estas islas se encuentran metiladas los genes se encuentran inactivos o silenciados, mientras que si no están metiladas se produce la expresión del gen. Este mecanismo se hereda y por tanto podemos decir que el genoma contiene información de dos maneras diferentes: la tradicional, la genética, que contiene la información en un código de pares de bases, y la nueva, la epigenética, que proporciona instrucciones adicionales de cómo, dónde y cuándo la información genética debe utilizarse.

En el año 2005, Anway y sus colaboradores observaron por primera vez un hecho de gran relevancia

medioambiental al constatar que dos compuestos de acción endocrina eran capaces de producir un efecto transgeneracional asociado a una alteración de los patrones de metilación del ADN [12]. Aunque diversos estudios posteriores ponen en entredicho este hallazgo, se hace necesario considerar este mecanismo de acción en futuros estudios ecotoxicológicos. El reto es adaptar las herramientas moleculares disponibles para valorar este posible efecto transmisible, pues desde un punto de vista ecotoxicológico cualquier cambio epigenético heredable (por ejemplo, metilación del ADN, modificación de histonas, condensación/descondensación de cromatina y ARNs no codificantes) podría traducirse en un efecto con consecuencias a nivel poblacional. Por tanto, los daños genéticos y epigenéticos deberían ser considerados en un esquema de evaluación de posibles mecanismos de efectos heredables.

## REFERENCIAS

- [1] EC, 2006. Reglamento CE N°1907 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas.
- [2] EC, 2009. Reglamento CE N°1107 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo.
- [3] EMEA, 2006. European Medicines Agency. Guideline on Environmental risk assessment of medicinal products for human use. EMEA/CHMP/SWP/4447/00.
- [4] EMEA, 2008. European Medicines Agency. Revised guideline on environmental impact assessment for veterinary medicinal products in support of the VICH guidelines GL6 and GL38. EMEA/CHMP/ERA/418282/2005.
- [5] Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B. Principles of Ecotoxicology (1996). Taylor & Francis. Londres (Reino Unido).
- [6] OECD, 2015. Guidelines for the testing of chemicals. 240. Medaka extended one generation reproduction test (MEOGRT).

- [7] OECD, 2015. Guidelines for the testing of chemicals. 241. The larval amphibian growth and development assay (LAGDA).
- [8] EFSA, 2013. European Food Safety Authority. Guidance Document on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. [www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific-output/files/main-documents/3290.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific-output/files/main-documents/3290.pdf)
- [9] Vethaak, D. Endocrine disruption in wildlife. Background, effects and implications. En: Endocrine Disruptors: Hazard Testing and Assessment Methods (2013). Peter Matthiessen (Ed). John Wiley & Sons, Inc. Nueva York (Estados Unidos).
- [10] OECD, 2012. Guidance document on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption. ENV/JM/MONO(2012)22.
- [11] Depledge, M.H. (1998). The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. Mutation Research 399(1), 109-122.
- [12] Anway, S.L., Cupp, A.S., Uzumau, M., Skinner, M.K. (2005). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male infertility. Science 308, 1466-1469.

Paloma Sánchez Argüello  
Dpto. de Medio Ambiente  
Instituto Nacional de Investigación y  
Tecnología Agraria y Alimentaria