



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Facultat de Ciències Biològiques

Toxicidad y acumulación de cadmio  
en poblaciones de diferentes  
especies de *Artemia*

Raquel Sarabia Álvarez  
Burjassot, Valencia  
2002

Foto portada modificada de Christian Gautier

Tesis presentada por Raquel Sarabia Álvarez para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universitat de València

Fdo. Raquel Sarabia Álvarez

Tesis dirigida por Javier Díaz Mayans, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Fisiología de la Universitat de València, y Amparo Torreblanca Tamarit, Doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Titular de Fisiología de la Universitat de València.

Fdo. Javier Díaz Mayans

Fdo. Amparo Torreblanca Tamarit

La investigación presentada en esta tesis se realizó en la Unidad de Fisiología Animal del Departamento de Biología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València, y fue financiada por una Beca Predoctoral del Programa de Proyectos de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico de la Generalitat Valenciana (Ref: GV-2512/94).



A Javi



## Agradecimientos

La ejecución de la tesis doctoral es en todos los casos la culminación de años de trabajo y esfuerzo personal que siempre requiere de la ayuda de los demás porque no somos máquinas y porque no estamos solos. Quiero en estas líneas expresar mi agradecimiento a todas las personas que también forman parte de este trabajo.

Expresar mi más sincero agradecimiento a Javier por depositar su confianza en mí para la realización de este trabajo, por ser el primero que creyó que este día podía llegar. Quiero dar las gracias de manera muy especial a Amparo y Jose por estar siempre disponibles para todo, por su amistad y por hacer posible este día. A Amparo por ser fuente continua de ideas, por escuchar las mías y ayudarme a clasificarlas y ordenarlas y por la paciencia que ha demostrado conmigo. A Jose por escucharme y hacer realidad en papel cada formato y cada tabla imposibles.

A Paco Amat e Inmaculada Varó por su inestimable ayuda en las experiencias de acumulación, por cedernos los quistes de *Artemia*, poner siempre a nuestra disposición sus instalaciones del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal y por responder a cualquier cuestión relacionada con la biología de *Artemia* que pudiera ocurrírse nos por rara que pareciera.

A Agustín Pastor por su inestimable ayuda en el análisis de las muestras de metal. A Mario por su ayuda en el análisis estadístico y por responder a mil y una preguntas de Modelos lineales generalizados, y a Mayte por dejarme acudir a su curso de doctorado de GLiMs.

A los miembros de la Unidad de Fisiología Animal con los que he compartido buenos ratos. A Loles y Rafa, por su disponibilidad y los ratos de café. A los gemelos, por ser compañía segura a cualquier hora intempestiva de la semana y por ser como son. A Fina por ser mi amiga. A las compañeras/os del laboratorio, Ame y Ana, por las horas amenas de compañía y a muchos otros que ya no están: Manuela, Kai, Carmen, Encarna, Monica..... A las nuevas generaciones, Neus, Lola y David que me han dado muchos ánimos en la recta final, por la ilusión que derrochan.

A mis amigos, porque creen y confían en mi.

Dar las gracias de manera especial a mis padres y hermanas, sin los que éste trabajo no habría comenzado, siempre pendientes y dispuestos a disculparme gratuitamente por muchos momentos de convivencia que me he perdido con ellos. A mis padres por creer en mi sin condiciones y por el esfuerzo que han puesto para que el día de hoy sea una realidad, gracias. A mis hermanas que han soportado mi carácter en casa, por comprenderme y llamarme a la distracción, recomendable de vez en cuando... y a toda la familia, a mis tios y primos, a Paquita y Wenceslao y a mis cuñados por su comprensión, por entender la importancia de este trabajo para mi y el apoyo que me han brindado.

A Javi, por las comas y puntos.....por estar siempre a mi lado, por su generosidad, su comprensión, su sentido del humor....

Gracias a todos.

Al menos una vez en la vida conviene poner todo en discusión.

Descartes



# ÍNDICE

<b>1.- INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
1.1.- <b>BIOLOGÍA DE <i>Artemia</i></b>	<b>1</b>
1.2.- <b>TAXONOMÍA Y BIOGEOGRAFÍA</b>	<b>5</b>
1.3.- <b>ECOLOGÍA DE LAS POBLACIONES DE <i>Artemia</i> ELEGIDAS EN EL PRESENTE TRABAJO.</b>	<b>8</b>
1.4.- <b>LA CONTAMINACIÓN POR CADMIO</b>	<b>12</b>
1.5.- <b>PROBLEMÁTICA ACTUAL DEL GÉNERO <i>Artemia</i></b>	<b>16</b>
1.6.- <b>OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS.</b>	<b>17</b>
1.7.- <b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>18</b>
<b>2.- TOXICIDAD AGUDA EN NAUPLIOS DE <i>Artemia</i></b>	<b>23</b>
2.1.- <b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>23</b>
2.2.- <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
2.2.1.- <b>Eclosión de los quistes</b>	<b>28</b>
2.2.2.- <b>Pruebas de toxicidad aguda.</b>	<b>28</b>
2.2.3.- <b>Evaluación de la toxicidad.</b>	
<b>Tratamiento de los datos y análisis estadístico.</b>	<b>30</b>
2.3.- <b>RESULTADOS</b>	<b>32</b>
2.4.- <b>DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
2.5.- <b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>49</b>
<b>3.- ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN/ELIMINACIÓN DE CADMIO EN LAS POBLACIONES DE <i>Artemia</i></b>	<b>55</b>
3.1.- <b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>55</b>
3.1.1.- <b>Biodisponibilidad</b>	<b>56</b>
3.1.2.- <b>Vías de entrada y distribución</b>	<b>57</b>
3.1.3.- <b>Modelos farmacocinéticos</b>	<b>58</b>
3.1.4.- <b>Modelo farmacocinético simple bicompartimental</b>	<b>59</b>
3.2.- <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>64</b>
3.2.1.- <b>Eclosión, crecimiento y aclimatación del cultivo.</b>	<b>64</b>
3.2.2.- <b>Cultivo de algas</b>	<b>64</b>
3.2.3.- <b>Aplicación de un modelo toxicocinético de acumulación y eliminación de cadmio en <i>Artemia</i>.</b>	<b>65</b>
3.2.4.- <b>Determinación del contenido de cadmio.</b>	<b>66</b>
3.2.5.- <b>Procesado de los datos y estudio cinético</b>	<b>67</b>
3.3.- <b>RESULTADOS</b>	<b>70</b>
3.4.- <b>DISCUSION</b>	<b>88</b>
3.5.- <b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>96</b>

**4.- NIVELES DE METALOTIONEÍNA EN *Artemia* **99****

<b>4.1.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>99</b>
<b>4.2.- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>102</b>
4.2.1.- Preparación de las muestras	102
4.2.2.- Análisis estadístico	103
<b>4.3.- RESULTADOS</b>	<b>104</b>
4.3.1.- Poblaciones expuestas a 0,5 mg Cd/L	104
4.3.2.- Poblaciones expuestas a 0,1 mg Cd/L	109
<b>4.4.- DISCUSIÓN</b>	<b>113</b>
<b>4.5.- BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>118</b>

**5.- DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES **121****

<b>5.1.- DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>121</b>
<b>5.2.- CONCLUSIONES</b>	<b>123</b>

**Abreviaturas **125****

# 1

## INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

### 1.1.- BIOLOGÍA DE *Artemia*.

*Artemia* es un crustáceo perteneciente a la Subclase Branchiopoda, cuyos componentes se caracterizan por estar dotados de apéndices torácicos en forma de hoja, y al Orden Anostraca, dada la ausencia de caparazón rígido.

Existe abundantísima información sobre su biología e, incluso, existe en Bélgica un Centro de Referencia para este género (*Artemia* Reference Centre, ACR, University of Ghent, Belgium). La mayor parte de la descripción que se hace a continuación ha sido extraída de la revisiones y trabajos realizados por el equipo de Dr Amat (Amat, 1985; Barata, 1994).

El cuerpo de *Artemia* es delgado y alargado, y está cubierto por un caparazón blando. Su longitud y aspecto son variables según la población/especie que se considere (bisexuales o partenogenéticas y diploides o poliploides) y según la salinidad y otras características físico-químicas del medio en que viven. Su tamaño oscila entre 7 y 12 mm de longitud, aunque puede alcanzar los 17-18 mm y, en casos extremos de algunas cepas partenogenéticas poliploides, pueden llegar a los 20 mm.

Externamente, pueden distinguirse tres partes bien diferenciadas: cabeza, tórax y abdomen. En la cabeza se distinguen los restos del ojo naupliar, los ojos compuestos, provistos de largos pedúnculos de longitud variable según las poblaciones, y las antenas, que en las hembras adoptan una forma sencilla y que en los machos presentan una porción anterior ensanchada en forma de tenaza, apropiada para sujetar a la hembra por la parte anterior de la bolsa ovígera en el

momento de la cópula. El tórax presenta once segmentos bien definidos dotados, cada uno, de un par de apéndices foliáceos denominados filópodos o toracópodos, con función natatoria, respiratoria y filtradora de las partículas alimenticias presentes en el medio, batiendo con un ritmo metacrónico de unos 150 - 200 golpes por minuto. Por último, el abdomen está formado por ocho segmentos ápodos. Los dos más próximos al tórax son los segmentos genitales, claramente más voluminosos que el resto de segmentos torácicos y abdominales. Estos dos primeros segmentos abdominales están hipertrofiados en su cara ventral, dando lugar a los respectivos aparatos sexuales: bolsa ovígera o útero en las hembras y vesícula seminal y pene en los machos. El último de los segmentos corresponde al telson, que presenta dos formaciones alargadas en disposición lateral que constituyen la furca caudal, con el borde erizado de largas sedas. En la escotadura entre ambos lóbulos se abre el orificio anal.

*Artemia* es un crustáceo filtrador o fagotrofo obligado. Mediante la actividad filtradora de sus toracópodos captura bacterias, algas unicelulares, pequeños protozoos y detritus del medio. Las partículas son arrastradas en dirección al atrio bucal e ingresan en el esófago y, de ahí, a un par de ventrículos globulares, asimilables a un estómago, donde se cree que pueden sufrir la acción digestiva. Posteriormente, el alimento ingresa en el tubo intestinal, formado por una capa sencilla de células epiteliales y una membrana peritrófica. Finalmente, los restos son eliminados por el ano en forma de cordones de heces de distinta coloración y consistencia, en función del alimento ingerido.

El aparato circulatorio está formado por un largo corazón tubular con un ostiolo en su extremo posterior y por varios senos en diversas zonas del cuerpo. A través del sistema circula hemolinfa, que contiene algunas células específicas, así como hemoglobina. La superficie respiratoria se halla directamente relacionada con la actividad locomotriz, ya que se localiza en los exopoditos de los toracópodos, que actúan a modo de branquias. En estos apéndices, la cutícula es más fina que en el resto del cuerpo y presentan en su interior un gran desarrollo de las cavidades que llena la hemolinfa, facilitando el contacto entre el medio exterior y la hemoglobina.

El éxito en la inoculación de *Artemia* en diferentes zonas de todo el mundo y su amplia distribución natural en diferentes ambientes continentales y litorales permite atribuirle una gran capacidad de adaptación y tolerancia a muy diversas situaciones y a un amplio rango de características medioambientales. Uno de los rasgos más notables de *Artemia* es su capacidad para habitar aguas de salinidades extremas, tanto aguas dulces como salinas saturadas de cloruro sódico (desde 10-20 g/l a más de 300 g/l), lo cual implica unas peculiaridades fisiológicas muy interesantes en lo que respecta al control de la concentración osmótica. Su hemolinfa se mantiene hiposmótica con respecto al medio ambiente, hasta el extremo de que, a una salinidad ambiental de 150 g/L la hemolinfa es ligeramente más concentrada que a una salinidad de 35 g/L (agua de mar), gracias a la excreción activa de sales al medio externo. Los exopoditos de los toracópodos de *Artemia* son sacos formados por un tegumento muy delgado que actúan a modo de branquias, dotados de unas cavidades para la hemolinfa muy amplias y desarrolladas, y de una cutícula muy permeable a los iones. Por esta cubierta se excreta activamente el NaCl, a partir de la hemolinfa, cuando el animal se encuentra en un medio hipertónico. En los nauplios esta actividad es llevada a cabo por el órgano nupal. La salinidad es uno de los factores que más influye en la morfología de *Artemia*. A salinidades elevadas se produce una reducción general del tamaño corporal, así como una serie de modificaciones características de la forma de la furca y una temprana aparición de la madurez reproductiva. Más sorprendente que los niveles de salinidad total que soporta *Artemia* es la variable composición iónica de las salmueras donde vive, pudiéndose encontrar en lagos salados clorurados, sulfatados, carbonatados, potásicos, etc...

*Artemia* también tolera un amplio rango térmico. La temperatura vital óptima está alrededor de 25-27 °C, estableciéndose los umbrales mínimos y máximos de supervivencia entre 6 y 35 °C.

Otra de las peculiaridades de *Artemia* es la capacidad de producir huevos císticos, de duración o de resistencia, también llamados quistes. Dichos quistes se forman a partir de una secreción de las glándulas de la cáscara, relacionada con la hematina, que cubre al huevo y forma una corteza de protección, lo que permite

mantener al embrión durante largo tiempo en criptobiosis. En ocasiones, la actividad de las glándulas de la cáscara es menor, produciendo una secreción menos copiosa, dando como resultado quistes (subitáneos) de los que se originan nauplios después de cortos periodos de tiempo, tras la emisión. No se sabe con certeza cuáles son los factores que inducen la formación de quistes, aunque parece ser que la causa más probable es la existencia de condiciones extremas del medio (bajos niveles de oxígeno, falta de alimento, alta salinidad, etc). Los quistes, una vez desecados y mantenidos en condiciones adecuadas, pueden mantenerse viables durante largos periodos de tiempo. La posibilidad de formar huevos císticos supone una importante adaptación en cuanto a la tolerancia de *Artemia* a temperaturas extremas, ya que permite la supervivencia de las poblaciones tanto a bajas (-271 °C durante varias horas) como altas temperaturas durante periodos prolongados de tiempo (entre 5 y 9 horas a 60-70 °C, que sólo reducen su viabilidad en un 15%). Precisamente, aunque la función del quiste es aún objeto de bastantes investigaciones, sus espectaculares características dan idea de lo importante que resulta para la protección del embrión. Resisten también bajas presiones, la acción de un buen número de disolventes (acetona, n-butanol, n-propanol, isopropanol, éter, xileno) y todo tipo de radiaciones. El corion de los quistes desecados presenta una gran capacidad de captar agua del ambiente, hasta un 200% de su peso.

Una vez hidratados, se reinicia el metabolismo interno que culmina con la rotura del corion y la salida al exterior del nauplio. El nacimiento de nauplios a partir de quistes consta de dos etapas. En la primera de ellas, el embrión rompe el corion y empieza a asomar al exterior. Durante esta fase (preemergencia) el embrión en fase de blástula o gástrula incipiente alcanza el estado de prenauplio. La segunda fase, de emergencia, se inicia cuando el nauplio se encuentra aún encerrado en la membrana cuticular y culmina cuando se rompe dicha membrana y sale al exterior, nadando libremente, alcanzando el estado de nauplio. Además de quistes, las hembras de *Artemia*, tanto si presentan reproducción bisexual como reproducción partenogénica, producen huevos que completan el desarrollo embrionario totalmente en el interior del útero de la madre y nacen directamente en forma de

nauplios perfectamente desarrollados (proceso ovovivíparo). La formación de los oocitos comienza en los ovarios, donde van aumentando de tamaño y acumulando vitelo mientras progresan por los oviductos para alcanzar el útero. La fecundación de los oocitos tiene lugar cuando se encuentran todos en la primera metafase meiótica. En el útero se inicia la segmentación del huevo y se completa el desarrollo embrionario hasta el estado de nauplio o se inicia el proceso de formación de quistes. A continuación, la hembra libera al exterior el contenido del útero.

## **1.2.- TAXONOMÍA Y BIOGEOGRAFÍA.**

El género *Artemia* es un grupo de especies gemelas y superespecies que se han definido recientemente por el criterio de aislamiento reproductivo. En el siglo pasado se creía que este género estaba formado por una sola especie, *Artemia salina* L., denominación debida a Leach (1819) (citado por Barata (1994)). Sin embargo, las sucesivas revisiones realizadas por Browne y Bowen (1991) y, recientemente, por Triantaphyllidis *et al.* (1998), adscriben a este género nueve especies aisladas reproductivamente que se distribuyen a lo largo de numerosas ecosistemas hipersalinos: *A. franciscana franciscana*, *A. franciscana monica*, *A. franciscana* sp., *A. persimilis*, *A. salina* (también llamada *A. tunisiana*), *A. urmiana*, *A. sínica* y *Artemia* sp. (procedente de Kazakhstan), especies todas ellas bisexuales, y *A. parthenogenetica* que está compuesta por múltiples poblaciones di-, tri-, tetra- y pentaploides que presentan reproducción partenogenética.

La partenogénesis, en el género *Artemia*, está limitada a Europa, Africa y Asia. Dentro de las poblaciones partenogenéticas, las poblaciones poliploides son más frecuentes en latitudes altas y bajas (<25°N y >40°N) que en regiones templadas (Zhang y Lefcort, 1991).

La mayoría de formas partenogenéticas de plantas y animales tienen una distribución geográfica diferente de las formas sexuales emparentadas, ya que, generalmente, tienden a encontrarse en latitudes superiores (Amat, 1983), que se corresponden con hábitats de temperaturas altas y bajas (Zhang y Lefcort, 1991). Las especies que encontramos en America (*A. franciscana franciscana*, *A.*

*franciscana monica*, *A. franciscana* sp. y *A. persimilis*) presentan reproducción bisexual. *A. persimilis*, exclusiva de Argentina, y recientemente encontrada también en Chile (Gajardo *et al.* 2001), presenta además, como característica particular, la existencia de un par de cromosomas adicionales (aneuploidía), lo que parece que le confiere aislamiento reproductivo. En Eurasia conviven tres especies bisexuales (*A. salina*, *A. urmiana* y *A. sinica*) con la especie partenogenética *A. parthenogenetica*. *A. urmiana* se considera exclusiva del lago Urmia (Irán) y *A. sinica* engloba las poblaciones endémicas de China. Recientemente, se está caracterizando una población procedente de Kazajistán, que podría ser considerada como una especie nueva. En África podemos encontrar poblaciones de *A. parthenogenetica*, *A. salina* y *A. franciscana*. Las poblaciones de *Artemia* presentes en Australia parece haber sido introducidas recientemente por el hombre y pertenecen a la especie *A. franciscana* (Lenz y Browne, 1991).

*Artemia* es un habitante típico de lagos y charcas hipersalinos que están caracterizados por albergar comunidades con una pequeña diversidad de especies y una estructura trófica bastante simple (Lenz y Browne, 1991). La asociación de *Artemia* con lugares de alta salinidad se debe a la ausencia en éstos de predadores y competidores. Estas comunidades biológicas son, a menudo, similares en estructura, lo cual ha llevado a una subestimación de la diversidad de las características físico-químicas de los hábitats de *Artemia*. Además *Artemia*, muestra poca variación morfológica, lo cual sugiere a su vez pocas diferencias entre poblaciones. Sin embargo, los estudios de laboratorio indican todo lo contrario; que las poblaciones de *Artemia* varían significativamente con respecto a los rasgos reproductivos, presumiblemente como resultado de presiones de selección en sus hábitats originales. La diversidad de los medios en que habita *Artemia* varía en función de la composición de aniones, las condiciones climáticas y la altitud. *Artemia* puede vivir en aguas ricas en cloruros, sulfatos o carbonatos, o en distintas combinaciones de ellos, dependiendo de qué aniones prevalezcan (Bowen *et al.*, 1985; Bowen *et al.*, 1988). Se puede encontrar a nivel del mar y hasta 4500 m de altitud en el Tibet (Xin *et al.*, 1994 citada de Triantaphyllidis *et al.* (1998)) y en

condiciones climáticas que van desde clima húmedo templado a árido (Vanhaecke *et al.*, 1987).

*Artemia* presenta una distribución muy amplia, extendiéndose por todos los continentes, excepto Antártida. La amplia distribución de *Artemia* se debe a causas naturales, como el transporte accidental por el viento (anemocoria) o las aves (zoocoria), o deliberada, por el hombre. Tryantaphyllidis *et al.* (1998) aporta una lista de distribución de *Artemia* en la que se citan unas 350 localidades. En la península ibérica, los trabajos de Amat (1980) han contabilizado alrededor de cuarenta cepas distribuidas en manantiales (lagunas saladas de aguas atalasohalinas), salinas y lagunas litorales. En la península Ibérica aparecen la mayoría de las especies de la región Paleártica: la forma bisexual mediterránea *A. salina* y la forma asexual *A. parthenogenetica*, con sus formas diploide y tetraploide, además de algunas poblaciones de *A. franciscana* introducidas en el sur de la península (Amat *et al.*, 1995). La importancia de la Península Ibérica en el estudio de la biogeografía de *Artemia* viene dada por el hecho de que existen poblaciones simpátricas bisexuales y partenogenéticas (Amat, 1980), como también se ha documentado en el lago Urmia (Irán) (Badaracco *et al.*, 1987). Desde el punto de vista ecológico, en la Península Ibérica se encuentran casi todos los ambientes hipersalinos descritos y colonizados por el género *Artemia* (Lenz y Browne, 1991), salinas costeras e interiores, generalmente asociadas a la explotación comercial de sal, y lagunas o lagos interiores de origen endorréico, caracterizados por tener salmueras de composición iónica diferente a la del mar (atalásicas).

A pesar de que en los estudios para comprender la especiación en *Artemia* se han considerado un amplio rango de características, la filogenia del género, y sobre todo, lo que atañe a las especies más estrechamente relacionadas, no está bien establecida (Gajardo *et al.*, 2001). La identificación de grupos dentro del género *Artemia* se ha basado en descripciones morfológicas (Amat, 1980; Schrehardt, 1987; Pilla y Beardmore, 1994; Triantaphyllidis *et al.*, 1996; Triantaphyllidis *et al.*, 1997; Triantaphyllidis *et al.*, 1997; Triantaphyllidis *et al.*, 1997), estudios de apareamiento en el laboratorio (Halfer-Cervini *et al.* 1968; Clark y Bowen, 1976

citados de Amat (1985); Pilla y Beardmore, 1994), estudios citogenéticos (Abatzopoulos *et al.*, 1987; Gajardo *et al.*, 2001) estudios de polimorfismo de proteínas (Abreu-Grobois y Beardmore, 1982; Pilla y Beardmore, 1994) y de características del ADN mitocondrial (Perez *et al.*, 1994) y nuclear (Badaracco *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1999).

A partir de dichos estudios, sobre todo en las últimas décadas, la atención de los investigadores ha ido ampliándose para dar cabida, junto con los estudios aplicados por el interés de *Artemia* en acuicultura, a la investigación de los mecanismos fisiológicos y genéticos que puedan explicar los patrones ecológicos y los mecanismos evolutivos de adaptación a los diferentes medios en que habita. Por todo lo anteriormente mencionado, el género *Artemia* es uno de los sistemas biológicos más prometedores para el estudio de la naturaleza del aislamiento ecológico y el proceso de especiación.

### **1.3.- ECOLOGÍA DE LAS POBLACIONES DE *Artemia* ELEGIDAS EN EL PRESENTE TRABAJO.**

En el presente trabajo, hemos estudiado diferentes poblaciones del género *Artemia* pertenecientes a cuatro especies diferentes: *A. parthenogenetica*, *A. salina*, *A. franciscana* y *A. persimilis*. Las poblaciones pertenecientes a las dos primeras especies son autóctonas de la Península Ibérica, excepto la procedente del norte de África, mientras que las pertenecientes a las dos últimas especies son poblaciones foráneas americanas. Todas ellas fueron cultivadas a partir de la eclosión de quistes recolectados en su medio natural y que pertenecían a la colección del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal que dirige el profesor Amat. A continuación, vamos a describir, brevemente, algunas de las características del medio original del que provienen, comenzando, en primer lugar, por las poblaciones foráneas.

Las poblaciones americanas de *Artemia* son todas bisexuales y pertenecen en su mayoría a la superespecie *A. franciscana*, con excepción de las poblaciones existentes en Argentina y Chile (Gajardo *et al.*, 2001). Nosotros hemos utilizado dos poblaciones de la especie *A. franciscana*: una originaria de la Bahía de San Francisco (California, USA), que abreviaremos como **SF** y otra, procedente de la

laguna salina de Macau (Rio Grande do Norte, Brasil), abreviada como **SF(Br)**. Esta última población fue inoculada para el aprovechamiento comercial en 1977 a partir de 250 g de quistes de la población de la Bahía de San Francisco. Además hemos usado quistes de una población de la especie *A. persimilis* procedente de las laguna de Salinas Grande de Hidalgo (Argentina).

*A. franciscana* se distingue de otras especies de *Artemia* por ser la que habita aguas con mayor diversidad en cuanto a su composición química y con un mayor rango de salinidades (entre 30 y 330 g/L). La mayoría de hábitats norteamericanos se caracterizan por poseer una estación que interrumpe el crecimiento poblacional de *Artemia*, causado por temperaturas cercanas a los 0°C en invierno, lo cual compromete la supervivencia de adultos, juveniles y nauplios. En las lagunas saladas temporales, las condiciones que limitan la supervivencia de las poblaciones de *Artemia* son la combinación de altas salinidades y desecación de las lagunas. SF se localiza a 37° 28' de latitud N y 122° 30' de longitud Oeste. En esta localización, la temperatura óptima para las poblaciones de *Artemia* se encuentra entre 24 y 25 °C. Varios factores, como la temperatura y duración de las estaciones de crecimiento son, probablemente importantes a la hora de determinar el número de generaciones por año. Normalmente, el pico de nauplios se produce a principios del verano y disminuye a finales de éste, coincidiendo con la caída en los niveles de alimento. La mayor concentración de adultos se produce a mediados y finales del verano. Otro importante aspecto, es el efecto que tiene la salinidad en la eclosión de los quistes. Éstos, comienzan a desarrollarse cuando disminuye la salinidad del medio a partir de un punto umbral, que es dependiente de cada cepa (85 g/L para el caso de la población de SF). A salinidades por encima de este punto, los quistes nunca eclosionan porque no se pueden hidratar lo suficiente, siendo la hidratación uno de los prerrequisitos para que pueda dar comienzo el metabolismo de la eclosión.

SF(Br) se localiza a 5° 00' de latitud S y 36° 40' de longitud Oeste. Como ya se ha mencionado procede de una inoculación artificial con quistes procedentes de la Bahía de San Francisco. Según citan Sorgeloos *et al.* (1980), parecía que la inoculación tenía, al principio, mucho éxito porque en ella se daban todas las

condiciones para el adecuado desarrollo de *Artemia*, y de hecho, al poco tiempo, *Artemia* se había extendido por las 3000 Ha de la extensión de la salina. Sin embargo, Lenz y Browne (1991) informaron que, aunque su producción fue alta durante los primeros 5 años desde la inoculación, a partir de entonces comenzó a descender en un orden de magnitud. Las bajas concentraciones de nutrientes y el consecuente descenso en la productividad primaria se sugieren como causas posibles. También se ha sugerido que la falta de estacionalidad del nuevo habitat y la temperatura más elevada, pudieran haber estado detrás de este fenómeno (Vanhaecke *et al.*, 1984).

*A. persimilis* es una especie única, por el hecho de poseer 44 cromosomas (aneuploidía) en lugar de 42, como ocurre en el resto de especies diploides. Habita lagunas cuyo compuesto principal es el cloruro sódico y otras sales de sulfato y magnesio, en menor medida. La población de *A. persimilis* de nuestro estudio (**A**) habita en Salinas Grandes de Hidalgo en Argentina. Estas salinas se encuentran ubicadas 11 Km al sudeste de la localidad de Macachín, a 37° 13' de latitud Sur y 63° 26' de longitud Oeste. Tiene 10 km de longitud y 5 km de ancho. Estas lagunas, a diferencia de las lagunas costeras, están sujetas a un clima continental y consisten en cuerpos de agua temporales periódicamente inundables sujetas a variaciones drásticas de temperatura a lo largo del año (Browne y Wanigasekera, 2000). Los primeros análisis revelaron un contenido de ClNa entre el 60 y 80% y desde menos de 1% hasta 6% de SO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>. Debajo de la capa madre suelen presentarse sales dobles poco solubles como glauberita (SO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>Ca), en el caso concreto de las Salinas Grandes (Hidalgo). Estos cuerpos salinos se designan como sulfateras porque de ellos se obtiene sulfato de sodio. Hay que hacer notar las variaciones en la composición o especiación de las sales a lo largo del año y que condiciona, por ejemplo, que la extracción del sulfato de sodio en la provincia de Buenos Aires y La Pampa se haga preferentemente en los meses de invierno, debido al diferente grado de solubilidad con respecto al cloruro de sodio, que se extrae en los meses de verano (Angelelli *et al.*, 1976).

La tercera población foránea pertenece a la especie *A. salina* y procede de la laguna de Megrine. Ésta, es una laguna costera cercana a la ciudad de Túnez que

se localiza a 36° 47´ de latitud N y 10° 14´ de longitud E, de la que no disponemos de demasiados datos, pero parece poseer características climáticas similares a las de las lagunas costeras de nuestra costa mediterránea. La población procedente de esta laguna se abreviará como **At**.

En cuanto a las poblaciones autóctonas destacamos, en primer lugar, las dos poblaciones que coexisten en la laguna de La Mata (Torrevieja, Alicante) (Amat *et al.*, 1991). Las dos poblaciones de *Artemia* pertenecen a dos especies diferentes: una población diploide perteneciente a la especie *A. parthenogenetica* y que designaremos como **LMT(PD)** y otra, bisexual, perteneciente a la especie *A. salina*, designada como **LMT(B)**. La coexistencia de las formas partenogenéticas y bisexuales en la laguna de La Mata comenzó a partir de 1989, como consecuencia de la introducción de la cepa bisexual procedente de la laguna de Torrevieja. Desde entonces, se produce un relevo de ambas poblaciones, que alternan sus máximas poblacionales en los meses invernales, para el caso de las poblaciones bisexuales, y en los meses de verano, para las especies partenogenéticas. La laguna de La Mata se halla situada en el extremo SO de la provincia de Alicante y forma parte del complejo salinero "Torrevieja-La Mata", a 38° 2´ de latitud N y 0° 41´ de longitud Oeste. Este complejo está formado por la laguna de Torrevieja, con una extensión aproximada de 1400 Ha, en la que se lleva a cabo la extracción de sal, y la Laguna de La Mata, de unas 700 Ha, a 1500 m al NE de la anterior y separada del Mar Mediterráneo por una franja de 1 Km de anchura. Son salinas litorales de elevada salinidad y de origen marino. La composición iónica se corresponde con la de las evaporitas marinas. La salmuera de Torrevieja, casi saturada, presenta 275 g de NaCl y 4-5 g de CaSO<sub>4</sub> por litro. El clima que caracteriza al área de La Mata se encuadra perfectamente en lo que se denomina "clima mediterráneo subdesértico" (Amat *et al.*, 1991), con una precipitación media de 210 mm anuales. La temperatura oscila, a lo largo del año, entre 16°C y 17°C en los meses de invierno, y entre 27°C y más de 30°C en verano. El mayor volumen de agua lo presentan en los meses otoñales de octubre y noviembre debido a las intensas lluvias invernales, disminuyendo en los meses posteriores debido a la evaporación, lo que provoca, al mismo tiempo un aumento de la salinidad de las lagunas.

También cercanas a la costa Mediterránea, se encuentran las salinas litorales del Delta del Ebro (36° 25' de latitud N y 6° 18' de longitud O) que presentan características climáticas y de composición química muy semejantes a la de La Mata. De estas salinas costeras de origen marino, procede, la población tetraploide de *Artemia*, abreviada como **D**, perteneciente a la especie *A. parthenogenetica*.

Por último, la población tetraploide procedente de la laguna de Pétrola pertenece a la especie *A. parthenogenetica*, abreviada como **P**. Ésta, es una laguna interior de origen atalásico. La dinámica de las poblaciones de *Artemia* que habitan estas lagunas está determinada principalmente por dos factores: la permanencia o no a lo largo de todo el año, debido a los altos niveles de evaporación y, en segundo lugar, a la predictibilidad, es decir, si la estacionalidad es o no previsible. En el caso de las lagunas interiores, las fluctuaciones de salinidad son extremas y las poblaciones pueden desaparecer cada año cuando la salina se seca o cuando las salmueras alcanzan el punto de saturación, ya que están sometidas a mayores diferencias de temperatura durante el año como consecuencia de la continentalidad del clima. En cuanto a la composición iónica, en salinas endorreicas el  $Mg^{2+}$ , suele ser más abundante que  $Ca^{2+}$  y  $K^+$ . El anión más abundante, en este caso, es el  $Cl^-$ , a pesar de que las salmueras de estas lagunas difieren del resto, tanto por su alto contenido de  $SO_4^{2-}$  como en la proporción de los iones  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cl^-$ , y  $SO_4^{2-}$ , debido a que la Laguna de Pétrola se localiza en la zona intermedia, entre las evaporitas marinas y las continentales (Barata, 1994).

#### **1.4.- LA CONTAMINACIÓN POR CADMIO.**

Los metales pesados son uno de los grupos de contaminantes más peligrosos por su persistencia y toxicidad, ya que pueden incorporarse a la cadena alimenticia y ser concentrados por los organismos. Entre ellos, el cadmio ha sido detectado en más de 1000 especies de flora y fauna, tanto acuática como terrestre. Sin embargo, no existe evidencia de que sea beneficioso biológicamente. El cadmio es un metal que no se encuentra libre en la naturaleza y sólo existe un mineral que lo contiene en cantidad apreciable, la greenckonita o sulfuro de cadmio. Es un elemento divalente, con un peso atómico de 48, masa atómica de 112,41, punto de

fusión 320,9 °C y punto de ebullición de 767 °C. Es fácilmente soluble en ácidos minerales, con los que forma las sales correspondientes y es insoluble en agua, aunque sus sales de cloro y sulfato sí lo son.

La incorporación natural de cadmio procede, principalmente, de la actividad volcánica, lixiviación de rocas e incendios forestales. Las fuentes antropogénicas de cadmio varían desde productos de la extracción de zinc, combustión de carbón, escoria de las minas, material catódico de baterías, producción de hierro y acero, y fertilizantes y pesticidas (U.S.EPA., 1999).

El impacto del cadmio en los organismos acuáticos depende de una gran variedad de formas químicas posibles que pueden afectar a la toxicidad y acumulación de los organismos. En este sentido, la utilización del cadmio por parte del hombre ha influido en sus efectos tóxicos en gran variedad de organismos, no sólo por las aportaciones antropogénicas al medio, sino también porque altera la especiación o forma química de los elementos. Los ciclos geológicos naturales de muchos metales están siendo alterados como consecuencia de las actividades humanas. Se considera que las rutas principales de entrada de metales derivadas de actividades humanas en medio acuático son la atmósfera y los ríos. Como consecuencia de esta actividad, los vertidos de cadmio son entre 1 y 3 órdenes de magnitud mayores que los procedentes de flujos naturales. Este impacto se ha notado en áreas tan lejanas como el ártico, sujeto a considerable control de la contaminación. La principal fuente del cadmio disuelto en los océanos es la atmósfera (Brown y Depledge, 1998).

Aunque, hasta el momento, no tenemos constancia de ningún vertido de origen mineral o industrial que haya contaminado severamente alguna salina, los metales llegan en mayor o menor grado a estos ecosistemas. Los lagos salinos se convierten lentamente en sumideros de todo tipo de elementos que se descargan en ellos a través de los ríos (Taher y Soliman, 1999).

**Tabla 1.1.** Estudios comparativos entre poblaciones de *Artemia*

ESPECIE	ESTADO DE DESARROLLO	PARÁMETRO ESTUDIADO	REFERENCIA
<i>A. franciscana</i> (poblaciones americanas de San Francisco Bay y Cabo Rojo) y <i>A. parthenogenetica</i> (poblaciones de Madrás y Kuttch, India)	Nauplios-juveniles y adultos	Experiencias de competición	(Browne, 1980)
<i>A. franciscana</i> (S. Francisco, Great Salt Lake, Puerto Rico y Shark Bay)	Adultos	Mortalidad por toxinas de <i>Ptychodiscus brevis</i>	(Medlyn, 1980)
<i>A. parthenogenetica</i> (4 poblaciones de España, Francia, Turquía e India), <i>A. salina</i> (población de Túnez España y Chipre), <i>A. franciscana</i> (poblaciones de norte y sudamérica) y <i>A. persimilis</i> (Argentina),	Adultos	Parámetros demográficos	(Browne <i>et al.</i> , 1984)
<i>A. franciscana</i> (15 poblaciones, norteamericanas y del Caribe)	De nauplios a adultos	Viabilidad en distintas composiciones de aniones	(Bowen <i>et al.</i> , 1985)
<i>A. parthenogenetica</i> (poblaciones de España, India y Francia), <i>A. salina</i> (poblaciones de Chipre y Túnez) y <i>A. franciscana</i> (S Francisco Bay)	De nauplios a adultos	Parámetros demográficos a diferentes temperaturas	(Browne <i>et al.</i> , 1988)
<i>A. parthenogenetica</i> (poblaciones de Francia, Turquía, España e India), <i>A. salina</i> (poblaciones de España, Chipre y Túnez) y <i>A. franciscana</i> (2 poblaciones de norteamérica y Suramérica)	Adultos	Experiencias de competencia entre las especies americanas y las demás	(Browne y Halanych, 1989)
<i>A. parthenogenetica</i> (población de Salin de Giraud, Francia)	Nauplios y adultos	Parámetros demográficos, análisis enzimáticos, supervivencia con diferentes salinidades y ADN mitocondrial	(Browne y Hoopes, 1990)
<i>A. parthenogenetica</i> (poblaciones diploide y pentaploide de Dong Fan Hong, China)	Nauplios y juveniles	Supervivencia y preferencia frente a la exposición a distintas temperaturas	(Zhang y Lefcort, 1991)
<i>A. parthenogenetica</i> (poblaciones de diferente ploidía de China, Italia y España)	de nauplios a adultos	Parámetros demográficos a distintas salinidades y temperaturas	(Zhang y King, 1993)
<i>A. franciscana</i> (varias poblaciones de San Francisco Bay y de Mejico)	de nauplios a adultos	Crecimiento	(Correa-Sandoval <i>et al.</i> , 1994)
<i>A. franciscana</i> (varias poblaciones: San francisco Bay, Brasil, Great Salt Lake y San Diego)	adultos	Composición bioquímica	(Correa-Sandoval <i>et al.</i> , 1994)
<i>A. franciscana</i> (varias poblaciones mejicanas: Yavarros, Sonora y San José)	adultos	Composición enzimática	(Correa-Sandoval y De la Rosa-Velez, 1994)

**Tabla 1.1. (Continuación)**

ESPECIE	ESTADO DE DESARROLLO	PARAMETRO ESTUDIADO	REFERENCIA
<i>A. franciscana</i> , <i>A. salina</i> , <i>A. sp</i> (población de Rusia), <i>A. sinica</i> , <i>A. urmiana</i> y <i>A. sp</i> (población de Yimeng)	Adultos	Aloenzimas, caracteres morfométricos y tests de aislamiento reproductivo	(Pilla y Beardmore, 1994)
<i>A. salina</i> (población española de Bon Matí) y <i>A. partenogenetica</i> (poblaciones españolas de La Mata y Trinidad)	adultos	Características reproductivas, supervivencia y eclosión, con la temperatura	(Barata <i>et al.</i> , 1995)
<i>A. salina</i> (población española de Bon Matí) y <i>A. partenogenetica</i> (poblaciones españolas de La Mata, Gerri, Trinidad y Pétrola)	de nauplios a adultos	Biomasa con la temperatura y estacionalidad	(Barata <i>et al.</i> , 1996)
<i>A. salina</i> (población española de Bon Matí) y <i>A. partenogenetica</i> (poblaciones españolas de La Mata, Gerri, Trinidad y Pétrola)	de nauplios a adultos	Parámetros demográficos	(Barata <i>et al.</i> , 1996)
<i>A. salina</i> (Bon Matí) y <i>A. partenogenetica</i> (La Mata, Trinidad, Delta del Ebro)	adultos	Parámetros demográficos, competencia y exclusión	(Barata <i>et al.</i> , 1996)
<i>A. franciscana</i> , <i>A. persimilis</i> , <i>A. sinica</i> , <i>A. urmiana</i> , <i>A. sp</i> , <i>A. partenogenetica</i> y <i>A. salina</i>	Adultos y quistes	Enzimas, Marcadores AFLP y caracteres morfológicos	(Triantaphyllidis <i>et al.</i> , 1997)
<i>A. franciscana</i> (S. Francisco, Brasil y Great Salt Lake), <i>A. persimilis</i> y <i>A. salina</i> (poblaciones españolas de La Mata, Málaga, y norteafricanas de Megrine y Argelia)	nauplios	Mortalidad por chlorpyrifos	(Varó <i>et al.</i> , 1998)
<i>A. partenogenetica</i> (poblaciones españolas de La Mata, Gerri, Bon Matí, Delta, Olmeda y Pétrola y una población de Kazakstan)			
<i>A. salina</i> (La Mata), <i>A. partenogenetica</i> (poblaciones de La Mata y Delta del Ebro)	adultos	Efecto de la temperatura en el consumo de oxígeno	(Varo <i>et al.</i> , 1998)
<i>A. franciscana</i> (S. Francisco Bay) y <i>A. persimilis</i> (varias poblaciones de Argentina)	Adultos, nauplios y quistes	Morfometría de adultos y nauplios y biometría de quistes. Test de aislamiento reproductivo	(Cohen <i>et al.</i> , 1999)
<i>A. franciscana</i> (S. Francisco Bay y Great Salt Lake) <i>A. partenogenetica</i> ((poblaciones de India, China, España y Francia) <i>A. sinica</i> (Yuncheng) y <i>A. urmiana</i>	De nauplio a adulto	Supervivencia y crecimiento expuestas a cobre	(Forbes <i>et al.</i> , 1999)
<i>A. franciscana</i> , <i>A. partenogenetica</i> , <i>A. sinica</i> , <i>A. tibetana</i> , <i>A. persimilis</i> y <i>A. urmiana</i>	Nauplios?	Marcadores AFLP	(Sun <i>et al.</i> , 1999)
<i>A. franciscana</i> (población de Chile) y <i>A. persimilis</i>	Adultos y quistes	Morfometría de los adultos y biometría de los quistes	(Zuñiga <i>et al.</i> , 1999)
<i>A. persimilis</i> (poblaciones de Chile y Argentina) y <i>A. franciscana</i> (poblaciones de Norteamérica y Sudamérica)	Nauplios	Número de cromocentros	(Gajardo <i>et al.</i> , 2001)

Cabe esperar que este fenómeno se de con mayor intensidad en los lagos salinos interiores donde, en su mayoría, la única vía de salida de agua es la evaporación, conduciendo a la concentración de estos elementos. Los ríos y pequeños afluentes que descargan en los lagos pueden contener cadmio procedente de yacimientos naturales o de residuos urbanos y actividades industriales, contribuyendo a la concentración y precipitación de éstos en un proceso lento, pero constante (Tayler *et al.*, 1980; Ghaheri *et al.*, 1999; Taher y Soliman, 1999). Además, hay que considerar la construcción de lagunas artificiales "revestidas o forradas", cuyo fin en sí mismo es la concentración, por evaporación, de sustancias contaminantes procedentes de la industria y la agricultura, con el fin de aislarlas para que no sean incorporadas a las corrientes fluviales, al océano o a los acuíferos (Tanner *et al.*, 1999). Muchas de estas lagunas se convierten en hipersalinas e incorporan especies propias de estos hábitats, como *Artemia*, que llega a través de las rutas migratorias de algunas aves. En estas circunstancias, *Artemia*, como filtrador en la cadena trófica, puede sufrir la exposición y acumulación de todo tipo de sustancias tóxicas, incluyendo el cadmio.

### **1.5.- PROBLEMÁTICA ACTUAL DEL GÉNERO *Artemia*.**

Durante la última década ha habido un fenómeno global de disminución de la salinidad en numerosos lagos salinos como consecuencia del cambio climático, influyendo negativamente sobre la disponibilidad de quistes de *Artemia* en lagos de importancia comercial, a la vez que se ha visto incrementada la demanda de quistes de *Artemia* para acuicultura (Lavens y Sorgeloos, 2000).

Además, se está produciendo de forma extensiva la inoculación con especies alóctonas de *Artemia* (principalmente *A. franciscana*) en salinas que cuentan con poblaciones naturales de este género, con el fin de explotar comercialmente los quistes o para mejorar la calidad de la sal. Este fenómeno pone en peligro la supervivencia de las poblaciones autóctonas. La Península Ibérica no es ajena a este problema, ya que algunas poblaciones autóctonas están siendo reemplazadas por *A. franciscana* (Amat, comunicación personal).

La protección de las poblaciones depende, en gran medida del esfuerzo dirigido a conocer su fisiología, demografía, genética, evolución, etc. En este sentido, existen abundantes trabajos que abordan la demografía y la tolerancia a los agentes estresantes naturales (salinidad y temperatura) de gran número de poblaciones (tabla 1.1). Sin embargo, para preservar la biodiversidad de este género, también es necesario conocer la tolerancia de las poblaciones a todos los tipos de estresantes ambientales, incluyendo los tóxicos generados o incrementados por la acción humana.

### **1.6.- OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS.**

El presente trabajo se centra en el estudio comparativo de distintos aspectos de la respuesta de las poblaciones de *Artemia* a la exposición a cadmio.

El objetivo del segundo capítulo de este estudio pretende poner de manifiesto la variabilidad fenotípica de la respuesta letal a la exposición a cadmio que presentan los nauplios de las poblaciones estudiadas. Para ello, es necesario, en primer lugar, determinar la sensibilidad de los nauplios de las poblaciones consideradas a la toxicidad del cadmio, a través de la respuesta letal. En segundo lugar, analizar la uniformidad de dicha respuesta dentro de cada población y, por último, comparar de una forma cuantitativa los aspectos mencionados de las distintas poblaciones.

El tercer capítulo aborda el estudio comparado del proceso de acumulación de cadmio en adultos de las distintas poblaciones. Para ello se utiliza un modelo matemático que describe el proceso y que permite la comparación del mismo en las distintas poblaciones a través de los parámetros que definen dicho modelo.

El cuarto capítulo analiza la presencia de metalotioneína, proteína presumiblemente implicada en la protección ante la toxicidad del cadmio en individuos adultos de *Artemia* y su incremento ante la exposición a dicho metal. Se estudia la influencia de la población considerada y del sexo en los niveles de dicha proteína.

## 1.7.- BIBLIOGRAFÍA.

- Abatzopoulos, T., Triantaphyllidis, G. y Kastritsis, C. D. (1987). Preliminary studies on some *Artemia* populations from northern Greece. Artemia Research and its Applications. Sorgeloos, P., Bengston, D. A., Declair, W. y Jaspers, E. Wetteren, Belgium, Universia Press. **1**: 107-114.
- Abreu-Grobois, F. A. y Beardmore, J. A. (1982). Genetic differentiation of the brine shrimp *Artemia*. Mechanisms of speciation. Barigozzi, C. New York, Alan R. Liss.: 345-376.
- Amat, F. (1980). Differentiation in *Artemia* strains from Spain. The brine shrimp Artemia: Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. y Jaspers, E. Wetteren, Belgium, Universia Press. **1**: 20-39.
- Amat, F. (1983). "Zigogenetical and parthenogenetical *Artemia* in Cadiz sea side salterns." *Marine Ecology Progress Series* **13**: 291-293.
- Amat, F. (1985). "Biología de *Artemia*." *Informes Tecnicos Instituto Investigaciones Pesqueras* **127**: 3-60.
- Amat, F., Barata, C., Hontoria, F., Navarro, J. C. y Varó, I. (1995). "Biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca) in Spain." *International Journal of Salt Lake Research* **3**: 175-190.
- Amat, F., Hontoria, F., Navarro, J. C., Gozalbo, A. y Varo, I. (1991). Bioecología de Artemia (Crustacea, Branchiopoda) en la laguna de La Mata. Alicante, Instituto de Cultura Juan Gil-Albert. Diputación de Alicante.
- Angelelli, V., Schalamuk, I. y Arrospide, A. (1976). Los yacimientos no metalíferos y rocas de aplicación de la región Patagónica-Comahue. *Anales XVII.*, Ministerio de Economía República Argentina: 144.
- Badaracco, G., Baratelli, L., Ginelli, E., Meneveri, R., Plevani, P., Valsasnini, P. y Barigozzi, L. (1987). "Variations in repetitive DNA and heterochromatin in the genus *Artemia*." *Chromosoma* **95**: 71-75.
- Badaracco, G., Bellorini, M. y Landsberger, N. (1995). "Phylogenetic study of bisexual *Artemia* using random amplified polymorphic DNA." *Journal of Molecular Evolution* **41**(2): 150-4.
- Barata, C. (1994). Caracterización ecológica de las poblaciones españolas de *Artemia*: Estrategias reproductivas y competencia. Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal. Consejo Superior de Invesigaciones Científicas. Castellón (Valencia).
- Barata, C., Hontoria, F. y Amat, F. (1995). "Life history, resting egg formation, and hatching may explain the temporal-geographical distribution of *Artemia* strains in the Mediterranean basin." *Hydrobiologia* **298**: 295-305.
- Barata, C., Hontoria, F. y Amat, F. (1996). "Estimation of the biomass production of *Artemia* with regard to its use in aquaculture : temperature and strain effects." *Aquaculture* **142**: 171-189.

- Barata, C., Hontoria, F., Amat, F. y Browne, R. (1996). "Competition between sexual and parthenogenetic *Artemia*: temperature and strain effects." *Journal of Experimental marine Biology and Ecology* **196**: 313-328.
- Barata, C., Hontoria, F., Amat, F. y Browne, R. (1996). "Demographic parameters of sexual and parthenogenetic *Artemia*: temperature and strain effects." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **196**: 329-340.
- Bowen, S. T., Buoncristiani, M. R. y Carl, J. R. (1988). "*Artemia* habitats: Ion concentrations tolerated by one superspecies." *Hydrobiologia* **158**: 201-214.
- Bowen, S. T., Fogarino, E. A., Hitchner, K. N., Dana, G. L., Chow, V. H. S., Buoncristinani, M. R. y Carl, J. R. (1985). "Ecological isolation in *Artemia*: Population differences in tolerance of anion concentrations." *Journal of Crustacean Biology* **5**(1): 106-129.
- Brown, M. T. y Depledge, M. H. (1998). Determinants of trace metal concentrations in marine organisms. Metal metabolism in aquatic environments. Langston, W. J. y Bebianno, M. J. London, Chapman & Hall. **7**: 185-217.
- Browne, R. y Wanigasekera, G. (2000). "Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **244**: 29-44.
- Browne, R. A. (1980). "Competition experiments between parthenogenetic and sexual strains of the brine shrimp, *Artemia salina*." *Ecology* **61**(3): 471-474.
- Browne, R. A. y Bowen, S. T. (1991). Taxonomy and population genetics of *Artemia*. *Artemia* Biology. Browne, R. A., Sorgeloos, P. y Trotman, C. N. A. Boca Raton, Florida, CRC. **9**: 221-235.
- Browne, R. A., Davis, L. E. y Sallee, S. E. (1988). "Effects of temperature and relative fitness of sexual and asexual brine shrimp *Artemia*." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **124**: 1-20.
- Browne, R. A. y Halanych, K. M. (1989). "Competition between sexual and parthenogenetic *Artemia*: a re-evaluation (Branchiopoda, Anostraca)." *Crustaceana* **57**(1): 57-71.
- Browne, R. A. y Hoopes, C. W. (1990). "Genotype diversity and selection in asexual brine shrimp (*Artemia*)." *Evolution* **44**(4): 1035-1051.
- Browne, R. A., Sallee, S. E., Grosch, D. S., Segrety, W. O. y Purser, S. M. (1984). "Partitioning genetic and environmental components of reproduction and lifespan in *Artemia*." *Ecology* **65**(3): 949-960.
- Cohen, R. G., Amat, F., Hontoria, F. y Navarro, J. C. (1999). "Preliminary characterization of some argentinean *Artemia* populations from La Pampa and Buenos Aires provinces." *International Journal of Salt Lake Research* **8**: 329-340.
- Correa-Sandoval, F. y De la Rosa-Velez, J. (1994). Allozymatic variation in three populations of *Artemia franciscana* (Kellog, 1906) from Mexico. Workshop on fish and mollusc larviculture, Puerto Montt, Chile.
- Correa-Sandoval, F., Voltolina-Lobina, D., Bückle-Ramirez, L. F. y Cordero-Esquivel, B. (1994). "The growth rates of four populations of *Artemia franciscana* (Anostraca: Artemiidae)." *Rev. Biol. Trop.* **42**(3): 605-609.

- Forbes, V. E., Møller, V., Browne, R. A. y Depledge, M. H. (1999). The influence of reproductive mode and its genetic consequences on the responses of populations to toxicants: a case study. Genetics and Ecotoxicology. Forbes, V. E., Taylor & Francis: 187-206.
- Gajardo, G., Beardmore, J. A. y Sorgeloos, P. (2001). "International study on *Artemia*. LXII. Genomic relationships between *Artemia franciscana* and *A. persimilis*, inferred from chromocentre numbers." *Heredity* **87**(Pt 2): 172-7.
- Ghaheeri, M., Baghal-Vayjooee, M. H. y Naziri, J. (1999). "Lake Urmia, Iran: a summary review." *International Journal of Salt Lake Research* **8**: 19-22.
- Lavens, P. y Sorgeloos, P. (2000). "The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture." *Aquaculture* **181**: 397-403.
- Lenz, P. H. y Browne, R. A. (1991). Ecology of *Artemia*. Artemia Biology. Browne, R. A., Sorgeloos, P. y Trotman, C. N. A. Boca Raton, Florida, CRC. **10**: 237-253.
- Medlyn, R. A. (1980). Susceptibility of four geographical strains of adult *Artemia* to *Ptychodiscus brevis* toxin(s). The Brine Shrimp *Artemia*. Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. y Jaspers, E. Wetteren, Belgium, Universa Press. **1**: 226-231.
- Perez, M. L., Valverde, J. R., Batuecas, B., Amat, F., Marco, R. y Garesse, R. (1994). "Speciation in the *Artemia* genus: mitochondrial DNA analysis of bisexual and parthenogenetic brine shrimps." *Journal of Molecular Evolution* **38**(2): 156-68.
- Pilla, E. J. S. y Beardmore, J. A. (1994). "Genetic and morphometric differentiation in Old World bisexual species of *Artemia* (the brine shrimp)." *Heredity* **73**: 47-56.
- Schrehardt, A. (1987). A scanning electron-microscope study of the post-embryonic development of *Artemia*. Artemia Research and its Applications. Sorgeloos, P., Bengston, D. A., Declair, W. y Jaspers, E. Wettwern, Belgium, Universa Press. **1**: 5-32.
- Sorgeloos, P. (1980). The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. The brine shrimp *Artemia*. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. y Jaspers, E. Wetteren, Universa Press. **3**.
- Sun, Y., Song, W., Zhong, Y., Zhang, R., Abatzopoulos, T. J. y Chen, R. (1999). "Diversity and genetic differentiation in *Artemia* species and populations detected by AFLP markers." *International Journal of Salt Lake Research* **8**: 341-350.
- Taher, A. G. y Soliman, A. A. (1999). "Heavy metal concentrations in surficial sediments from Wadi El Natrun saline lakes, Egypt." *International Journal of Salt Lake Research* **8**: 75-92.
- Tanner, R., Glenn, E. P. y Moore, D. (1999). "Food chain organisms in hypersaline industrial evaporation ponds." *Water Environment Research* **71**(4): 494-505.
- Taylor, P. L., Hutchinson, L. A. y Muir, M. K. (1980). "Heavy metals in the Great Salt Lake, Utah." *Utah Geological and mineral Survey* **116**: 195-200.

- Triantaphyllidis, G., Abatzopoulos, T. y Sorgeloos, P. (1998). "Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostracea)." *Journal of Biogeography* **25**: 213-226.
- Triantaphyllidis, G., Criel, G. R. J., Abatzopoulos, T. y Sorgeloos, P. (1997). "International study on *Artemia*. LIII. Morphological study of *Artemia* with emphasis to old world strains. I. Bisexual populations." *Hydrobiologia* **357**: 139-153.
- Triantaphyllidis, G., Criel, G. R. J., Abatzopoulos, T. J. y Sorgeloos, P. (1997). "International study on *Artemia*. LIV. Morphological study of *Artemia* with emphasis to Old World strains.II. Parthenogenetic populations." *Hydrobiologia* **357**: 155-163.
- Triantaphyllidis, G., Criel, G. R. J., Abatzopoulos, T. J., Thomas, K. M., Peleman, J., Beardmore, J. A. y Sorgeloos, P. (1997). "International Study on *Artemia*. LVII. Morphological and molecular characters suggest conspecificity of all bisexual European and North African *Artemia* populations." *Marine Biology* **129**: 477-487.
- Triantaphyllidis, G. V., Abatzopoulos, T., Miasa, E. y Sorgeloos, P. (1996). "International Study on *Artemia*. LVI. Characterization of two *Artemia* populations from Namibia and Madagascar: cytogenetics, biometry, hatching characteristics and fatty acid profiles." *Hydrobiologia* **335**: 97-106.
- U.S.EPA. (1999). Integrated approach to assessing the bioavailability and toxicity of metals in surface water and sediments. Washington, D.C., Office of Water.
- Vanhaecke, P., Siddall, S. E. y Sorgeloos, P. (1984). "International study on *Artemia*. XXXII. Combined effects of temperature and salinity on the survival of *Artemia* of various geographical origin." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **80**: 259-275.
- Vanhaecke, P., Tackaert, W. y Sorgeloos, P. (1987). The biogeography of *Artemia*: an updated review. *Artemia Research and its Applications*. Sorgeloos, P., Bengston, D. A., Declair, W. y Jaspers, E. Wetteren, Belgium, Universia Press. **1**: 129-156.
- Varó, I., Serano, R., Navarro, J. C., Lopez, F. J. y Amat, F. (1998). "Acute lethal toxicity of the organophosphorus pesticide chlorpyrifos to different species and strains of *Artemia*." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **61**: 778-785.
- Varó, I., Taylor, A. C. y Amat, F. (1998). "The effects of temperature and oxygen tension (PO<sub>2</sub>) on the oxygen consumption rates of adults of different *Artemia* strains." *Comparative Biochemistry and Physiology* **120** (Part A): 385-390.
- Zhang, L. y King, C. E. (1993). "Life history divergence of sympatric diploid and polyploid populations of brine shrimp *Artemia parthenogenetica*." *Oecologia* **93**: 177-183.
- Zhang, L. y Lefcort, H. (1991). "The effects of ploidy level on the thermal distributions of brine shrimp *Artemia parthenogenetica* and its ecological implications." *Heredity* **66**: 445-452.

Zuñiga, O., Wilson, R., Amat, F. y Hontoria, F. (1999). "Distribution and characterization of Chilean populations of the brine shrimp *Artemia* (Crustacea, Branchipoda, Anostraca)." *International Journal of Salt Lake Research* **8**: 23-40.

# 2

## TOXICIDAD AGUDA EN NAUPLIOS DE ARTEMIA

### 2.1.- INTRODUCCIÓN

*Artemia* posee varias características que han facilitado su uso en estudios de toxicología, como son un corto periodo de generación (aproximadamente 20 días en condiciones óptimas), su facilidad de manejo, almacenamiento, cultivo y su disponibilidad. Estas características coinciden con algunas de las recomendaciones hechas en la selección de organismos para test de toxicidad (tabla 2.1). Todas estas razones han propiciado el uso de *Artemia* en toxicología. En el caso que nos ocupa son numerosos los trabajos que han estudiado diversos aspectos de la toxicidad de los metales pesados en *Artemia*. En la tabla 2.2 se recoge una selección de estos trabajos. Como se puede apreciar, la mayor parte de los estudios se han realizado con *A. franciscana*, especie considerada de referencia en este tipo de estudios, o se cita como *A. salina* sin tener en cuenta el origen de los quistes.

La existencia de variedad de especies y cepas de *Artemia* que difieren en su modo de reproducción, grado de ploidía y origen, ofrece una excelente oportunidad para estudiar las diferencias inter e intraespecíficas en relación con la tolerancia a las sustancias tóxicas. Además, la disponibilidad y facilidad de transporte de diversas poblaciones a partir de los quistes recolectados en su hábitat natural, convierten a *Artemia* en un candidato idóneo para todo tipo de estudios comparativos (Abreu-Grobois, 1987).

Sin embargo, existen pocos trabajos en los que se plantee la variabilidad interpoblacional e interespecífica en la respuesta a la toxicidad de los metales en el género *Artemia*, siendo el más reciente el de Forbes *et al.* (1999). Esto mismo

podría hacerse extensible para el resto de sustancias tóxicas, donde cabe destacar los estudios realizados por Varó *et al.* (1997; 1998).

Entre los métodos desarrollados para evaluar el efecto potencial de las sustancias tóxicas se encuentran las pruebas de toxicidad aguda, que consisten en experiencias en las que se estiman los efectos perjudiciales de dichas sustancias a través de la respuesta de los organismos, expuestos a un rango de concentraciones de la sustancia estudiada durante cortos periodos de exposición (en relación con la duración del ciclo vital del organismo considerado). Los ensayos estandarizados de toxicidad son útiles porque informan de la toxicidad relativa de las sustancias y de la sensibilidad de las especies, pueden ser comparados o calibrados con observaciones en el medio real y son repetibles, rápidos y fácilmente interpretables. Asimismo, la mortalidad es uno de los parámetros más utilizados en estudios de toxicidad aguda porque, a pesar de presentar algunas limitaciones, ha demostrado ser sencillo de interpretar y fácil de medir (Giesy y Graney, 1989).

**Tabla 2.1.** Criterios para la selección de especies en los tests de toxicidad (modificado de Rand, 1995).

RECOMENDACIÓN	GÉNERO <i>Artemia</i>
Diferentes especies con un amplio rango de sensibilidades	Diferentes especies con gran variabilidad genética subyacente
Abundancia y disponibilidad	Gran cantidad de quistes recolectados disponibles presentes en muchas salinas
Ecológicamente relevante	Ecosistemas pobres en diversidad
Repercusión económica y comercial	Uso generalizado en Acuicultura como alimento de otras especies de interés comercial
Fácil mantenimiento	Fácil cultivo y mantenimiento
Información disponible	Amplias bases de datos bibliográficas sobre el uso de <i>Artemia</i> en estudios bioquímicos, ecológicos....

**Tabla 2.2.** Estudios de toxicidad de metales realizados en *Artemia*.

ESPECIE	ESTADO DESARROLLO	METAL	CONCENTRACIÓN (mg/l)	TIEMPO DE EXPOSICIÓN (horas)	PARÁMETRO ESTUDIADO	REFERENCIA
<i>A. franciscana</i>	adultos?	cobre	---	24	CL50	(Brown y Ahsanullah, 1971)
<i>Artemia</i> sp	nauplios?	mercurio	1000	3	CL50	(Jung, 1975)
<i>Artemia</i> sp	nauplios?	mercurio	10	8	CL50	(Jung, 1975)
<i>A. salina</i> ??? (dos poblaciones de Norteamérica, 1 del Caribe, posiblemente <i>A. franciscana</i> , y otras 2 de la India, posiblemente <i>A. parthenogénica</i> )	adultos	cobre	0,1-10 <sup>5</sup>	> 480	TL50 y reproducción	(Browne, 1980)
<i>A. franciscana</i> (Macau, Brasil)	nauplios	cadmio y otros metales	0,5-0,1	24	CL50	(Trief, 1980)
<i>A. salina</i> (posiblemente <i>A. franciscana</i> ?)	nauplios y quistes	cadmio y otros metales	0-200	48	CL50 y eclosión	(Kissa <i>et al.</i> , 1984)
<i>A. franciscana</i> (población canadiense del Lago Chaplin)	nauplios (instar I-III)	cadmio y mercurio	--	6 y 24	CL50 ...	(Sleet y Brendel, 1985)
<i>A. franciscana</i> (dos poblaciones: San Francisco Bay y GSL)	nauplios	selenio y cadmio	1,98-79 y 100	24-168-336 24	CL50	(Freeman <i>et al.</i> , 1987)
<i>Artemia salina</i> ? (posiblemente <i>A. franciscana</i> )	adultos	cobre y cromo	0,485 y 12,838	48	CL50	(Verripoulos <i>et al.</i> , 1987)
<i>A. franciscana</i> (GSL)	adultos	cadmio	30-120	24-96	TL50 y CL50, acumulación y MT	(Martinez, 1989)
<i>A. salina</i>	nauplios	cadmio	100-300	24	CL50	(Borowitz y McLaughlin, 1992)
<i>A. franciscana</i> (población de GSL)	adultos	cadmio	20 y posteriormente 10	24 y posteriormente 14 días	Efecto de la preexposición a Cd e inducción de MT	(Del Ramo <i>et al.</i> , 1993)
<i>A. franciscana</i> (dos poblaciones americanas) <i>A. parthenogenetica</i> (cuatro poblaciones, de India, España, China y Francia) y <i>A. urmiana</i>	nauplios	cobre	0,05 y 0,1	6 y 12 días	Supervivencia y crecimiento	(Forbes <i>et al.</i> , 1999)

CL50: Concentración letal 50

TL50: Tiempo letal 50

MT: metalotioneína

Dos de los parámetros más utilizados para comparar la sensibilidad del tóxico son la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), definida como la estima de la concentración a la cual mueren el 50% de los individuos expuestos a una sustancia tóxica en un tiempo de exposición determinado, y la menor concentración a la que se observa efecto significativo con respecto al grupo control (LOEC). Asimismo, la pendiente de la curva de mortalidad es, desde un punto de vista toxicológico, un indicador del mecanismo de toxicidad y un índice de la variabilidad de respuesta desde un punto de vista poblacional. Por todo ello ha sido utilizada para comparar la respuesta letal en diferentes poblaciones de distintos grupos de organismos (Rand, 1995).

La variabilidad intra e interespecífica son dos de los factores de mayor interés en los tests de toxicidad rutinarios con vistas a la estandarización. El estudio de la variabilidad dentro y entre poblaciones/especies de *Artemia*, por tanto, además de ofrecer una excelente oportunidad para caracterizar las poblaciones y estudiar los factores que pueden influir en la adquisición de tolerancia frente a la toxicidad del cadmio, puede proporcionarnos información sobre la fiabilidad/confianza que nos proporcionan estos tests de toxicidad según qué población/especie consideremos.

El cadmio es uno de los tóxicos de referencia y está entre los contaminantes más extendidos (Goering *et al.*, 1995). Aunque, hasta la fecha no existe constancia de ninguna contaminación severa de cadmio en salinas, sí se han constatado vertidos urbanos e industriales que contienen cadmio y aportaciones de yacimientos naturales (Tayler *et al.*, 1980; Ghaheri *et al.*, 1999; Taher y Soliman, 1999). Por tanto *Artemia* puede, potencialmente, sufrir la exposición y acumulación de dicho metal.

En este contexto, creemos relevante estudiar la biodiversidad existente dentro del género *Artemia* mediante la evaluación de la respuesta letal a la exposición tóxica del cadmio en poblaciones naturales.

Para lograr este objetivo general fue necesario establecer unas condiciones de ensayo de toxicidad que permitieran realizar comparaciones entre las distintas poblaciones estudiadas, así como la selección de un tipo de análisis estadístico, que además de ser compatible con el diseño experimental utilizado y los datos a analizar, nos permitiera contrastar nuestras hipótesis.

## 2.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

En este capítulo hemos estudiado la respuesta de distintas poblaciones de *Artemia* frente a la exposición aguda de cadmio de las poblaciones seleccionadas de *Artemia* que aparecen en la tabla 2.3. Con este objeto, se evaluó la mortalidad de los nauplios a las 24 horas y se calculó la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>).

**Tabla 2.3.** Poblaciones de *Artemia* estudiadas. Especie, lugar de origen, ploidía, modo de reproducción, habitat.

ESPECIES	Origen	Abreviatura	Ploidía	Modo de reproducción	Habitat
<i>A. persimilis</i> (1992) (*)	Argentina	A	aneuploide	bisexual	salina interior
<i>A. tunisiana</i> (1991)	Laguna de La Mata, Alicante (España)	LMT (B)	diploide	bisexual	salina costera
<i>A. tunisiana</i> (1994)	Megrine (Túnez)	At	diploide	bisexual	salina costera
<i>A. franciscana</i> (1993)	San Francisco Bay Brand (USA)	SF	diploide	bisexual	salina costera
<i>A. franciscana</i> (1994)	Macau (Brasil)	SF (Br)	diploide	bisexual	salina costera
<i>A. parthenogenetica</i> (1990)	Laguna de Pétrola, Albacete (España)	P	tetraploide	partenogenética	lago salado (interior)
<i>A. parthenogenetica</i> (1988)	Laguna de La Mata, Alicante (España)	LMT (PD)	diploide	partenogenética	salina costera
<i>A. parthenogenetica</i> (1984)	Delta del Ebro (España)	D	tetraploide	partenogenética	salina costera

(\*) Fecha de recolección del lote del que procede la población.

Para la realización de estos ensayos, se han seguido las normas de la UNEP (United Nations Environmental Program) (1987; 1989; 1989), con algunas modificaciones.

#### 2.2.1.- Eclosión de los quistes

Los nauplios se obtuvieron a partir de la eclosión de quistes de las poblaciones mencionadas. Para ello, en primer lugar, los quistes fueron hidratados durante dos horas en agua destilada y, a continuación, se enjuagaron vigorosamente en agua marina artificial obtenida a partir de sal Instant Ocean<sup>®</sup> y se depositaron en recipientes cilíndricos de eclosión de 1 L de capacidad. A continuación, los quistes se mantuvieron en agitación constante mediante fuerte aireación con la ayuda de un difusor de aire a una temperatura de 23°C e iluminación constante.

#### 2.2.2.- Pruebas de toxicidad aguda.

En los experimentos preliminares de toxicidad se observaron diferencias en la velocidad de desarrollo de los nauplios correspondientes a las distintas poblaciones de nuestro estudio, por lo que fue necesario realizar los ensayos de toxicidad, no a una edad fija de los nauplios, sino a un estado de desarrollo determinado, con el fin de evitar las diferencias fisiológicas de los primeros estadios de desarrollo de *Artemia*, que, a su vez, podrían enmascarar las diferencias de sensibilidad en las distintas poblaciones de nauplios. En nuestro caso se eligió el estado larvario *instar II*, que no siendo ya completamente impermeable, permite todavía que el test de toxicidad se realice sin necesidad de alimentar a los individuos (Sleet y Brendel, 1985); Varó, comunicación personal).

Las pruebas de toxicidad aguda se realizaron en placas multipocillo (Multiwell <sup>®</sup>), consistiendo cada prueba en el ensayo de 7 concentraciones crecientes de cadmio y un grupo control, con seis réplicas cada uno. Para cada cepa/especie, se llevaron a cabo 2 pruebas.

Cada pocillo contenía un volumen total de 2 mL, consistente en agua marina artificial (Instant Ocean<sup>®</sup>), en el caso de los grupos control, y una solución de agua

marina más la cantidad correspondiente de cadmio, para cada una de las concentraciones crecientes de dicho metal ensayadas.

Las concentraciones ensayadas fueron diferentes para cada población/especie, dependiendo de su sensibilidad. Para determinar el rango de concentraciones de los tests de toxicidad aguda en cada una de las poblaciones, se realizaron pruebas de tanteo con las siguientes concentraciones nominales de cadmio: 0, 100, 200, 250, 300, 350, 400 y 500 mg/l. Para la preparación de las distintas disoluciones se partió de una solución stock de 2000 mg de Cd/L.

A continuación se situaron en cada pocillo 10 nauplios *instar II* con la ayuda de una pequeña pipeta de plástico alargada que aseguraba que al depositar los nauplios, no se añadiera más volumen a cada pocillo que pudiera diluir las soluciones.

Por último, se incubaron las placas a 23°C, con fotoperiodo de 12 h de luz/12 h oscuridad. No se suministró alimento alguno a los nauplios.

Tras 24 horas de incubación, se contaron los individuos muertos. El "criterio de muerte" fue la inmovilidad. Los animales eran observados a la lupa, considerándolos muertos si no había movimiento de los apéndices ni del tracto digestivo.

Al final de cada experiencia, se analizaron las concentraciones reales de cadmio de los pocillos mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica de Llama. En la tabla 2.4, se presentan las concentraciones nominales de cadmio y las concentraciones reales tras el tiempo de exposición que duró la prueba en ausencia de nauplios. Las diferencias de concentración se atribuyen, principalmente, a la adsorción a las paredes de los pocillos, precipitación y volatización. Para los cálculos posteriores, se utilizaron los valores de concentraciones reales de metal.

**Tabla 2.4.** Concentraciones nominales y reales de cadmio en las pruebas de toxicidad (media  $\pm$  desviación estándar);  $n \geq 6$ , ND, valores de cadmio medido no detectables.

Concentración nominal (mg/l)	Concentración real (mg/l)
0	ND
50	40,8 $\pm$ 2,6
75	56,9 $\pm$ 2,6
100	67,0 $\pm$ 2,4
115	89,0 $\pm$ 2,8
125	93,0 $\pm$ 2,0
135	96,9 $\pm$ 2,4
150	105,8 $\pm$ 5,7
155	112,0 $\pm$ 5,2
175	122,3 $\pm$ 6,7
200	152,6 $\pm$ 7,8
225	168,8 $\pm$ 7,1
250	182,6 $\pm$ 5,3
275	207,1 $\pm$ 5,5
300	234,4 $\pm$ 4,5
325	243,0 $\pm$ 5,7
350	253,7 $\pm$ 7,3
400	283,3 $\pm$ 8,5
450	331,2 $\pm$ 6,5
500	348,7 $\pm$ 6,1

2.2.3.- Evaluación de la toxicidad. Tratamiento de los datos y análisis estadístico.

Para la evaluación de la toxicidad del cadmio en las diferentes poblaciones estudiadas se utilizaron Modelos Lineales Generalizados (GLiM) de regresión logística, siguiendo la metodología descrita por Kerr y Meador (1996). Esta metodología presenta varias ventajas con respecto a la metodología clásica de regresión de las proporciones de mortalidad transformadas en probits o logits, como son: que no requiere una distribución normal de los valores residuales, ni la igualdad de varianzas, y que considera el tamaño muestral (Parker *et al.*, 1999), entre otras. Los modelos GLiM se pueden ajustar a diferentes tipos de distribuciones, sin transformar los datos originales, entre las que se encuentra la distribución binomial, acorde con los datos generados en este tipo de experiencias. Este tipo de modelos se explicitan a partir de dos componentes: una "función de relación" que describe la relación dosis-respuesta (proporción de individuos que mueren,  $p$ ), por medio de una combinación lineal de predictores y una función de varianza. La primera componente no se diferencia mucho a la aproximación del

método clásico (mediante regresión de las proporciones de mortalidad transformados en probits o logits) y como en ésta puede utilizar en el caso de distribuciones binomiales las funciones probit o logit. La elección de esta función de relación, es de gran importancia ,ya que refleja la naturaleza biológica del punto final (mortalidad, fecundidad, crecimiento, biomasa, etc...) elegido en cada estudio para evaluar la toxicidad de una sustancia. Nosotros elegimos la función logit, por ser la función canónica descrita en la bibliografía (Piegorisch y Bailer, 1997).

$$\ln(p/1-p) = \beta_0 + \beta_1 \text{concentración}$$

A continuación obtenemos el valor de p, invirtiendo la ecuación:

$$p = \frac{e^{(\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{concentración})}}{1 + e^{(\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{concentración})}}$$

La segunda componente es una función de la varianza que describe la distribución de probabilidad de los datos, que como ya mencionamos se ajustan a una distribución binomial:

$$\text{Respuesta} \sim \text{bin} (N, \frac{e^{(\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{concentración})}}{1 + e^{(\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{concentración})}})$$

Siendo N en total de individuos del test. La estimación de los coeficientes  $\beta_0$  y  $\beta_1$  del modelo usa un método de manera que se minimice una cantidad conocida como desviación, que es la máxima cantidad verosímil para los datos experimentales obtenidos y se define de diferente manera para cada distribución de probabilidad.

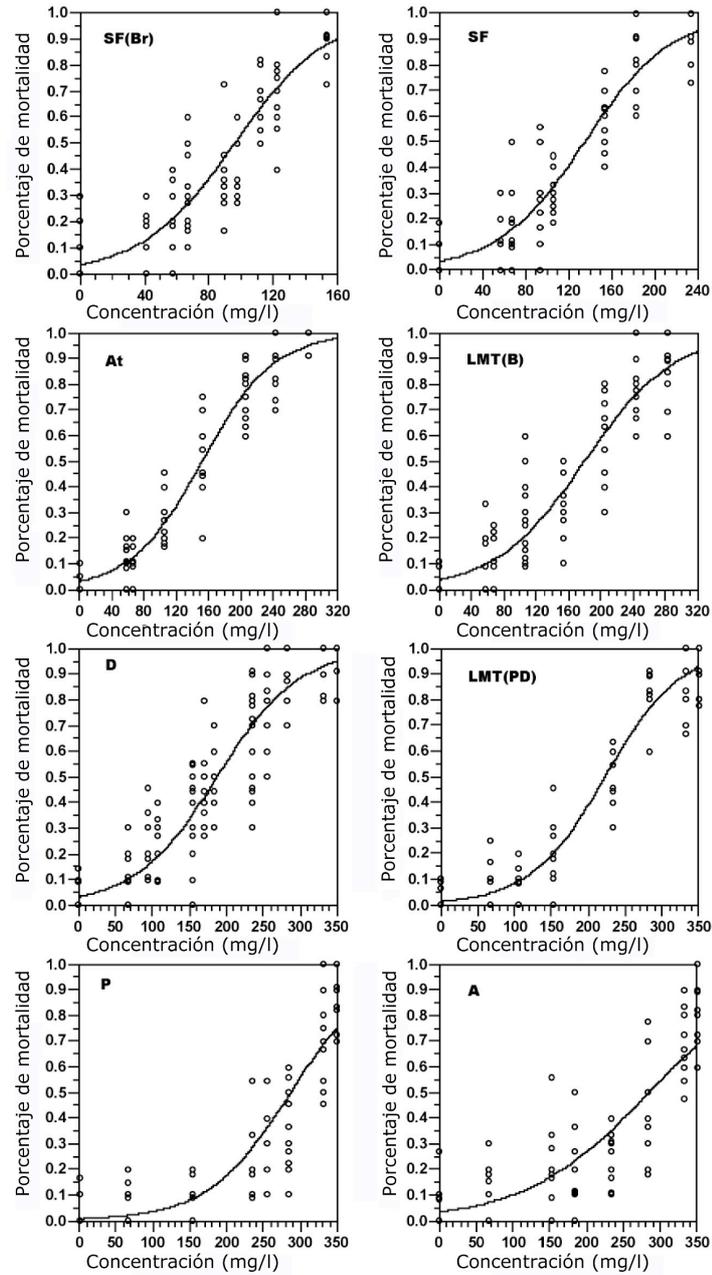
La aplicación de un modelo lineal generalizado requería, en primer lugar, decidir qué elementos se debían considerar como factores que podían estar influyendo en la mortalidad de *Artemia* frente a la exposición a cadmio. Para ello, se realizó un análisis estadístico de manera jerárquica, analizando sucesivamente la influencia de los distintos factores. En primer lugar, se incluyó el factor CONCENTRACIÓN, al que añadimos CONCENTRACIÓN + ESPECIE y la interacción de ambas, CONCENTRACIÓN + ESPECIE + (CONCENTRACIÓN x ESPECIE). De un modo similar analizamos la influencia del factor POBLACIÓN dentro de cada especie por separado. Por último, realizamos un análisis en conjunto en el que consideramos todas las poblaciones estudiadas por separado, opción por la que finalmente optamos. Además, se evaluó un posible "efecto placa". Sin embargo, dada la consistencia entre las réplicas, se decidió, según el principio de parsimonia, no

considerar este factor, con el fin de obtener el modelo más sencillo. Para comprobar si existía un diferente comportamiento de las ocho poblaciones de *Artemia*, individualmente, frente a la exposición a concentraciones crecientes de cadmio, las proporciones de mortalidad se ajustaron a un modelo de distribución binomial, usando la función canónica *logit* con la ayuda del programa estadístico GLMstat 5.6.4 (Ken Beath; <http://www.ozemail.com.au/~kjbeath/glmstat.html>). A continuación, con las estimas obtenidas de los ajustes del modelo,  $\beta_1$  y  $\beta_0$  (pendiente y punto de corte respectivamente), que describían la respuesta de cada una de las poblaciones, se realizaron dos tipos de contrastes por parejas: 1) atendiendo a las diferencias en pendiente y 2) a las diferencias en pendiente y punto de corte. A ambos tipos de contrastes se les aplicó la corrección de Bonferroni.

A continuación, a partir de estas estimas, y según Kerr y Meador (1996), se calcularon los valores de  $CL_{50}$  para la función *logit* con la ayuda del módulo de Excel® GLMCp (Info-Mac Archives, <http://www.info-mac.com>). Mediante este método, se obtiene la concentración correspondiente a una mortalidad del 50% ( $CL_{50}$ ), y los límites de confianza para una probabilidad del 95%, así como los intervalos de confianza de mortalidad correspondientes a dicha concentración con una probabilidad del 95%. Además se calcularon otras estimas como la  $CL_{10}$ ,  $CL_{70}$  y por último la concentración que muestra el menor efecto observado o LOEC mediante método gráfico según Kerr y Meador (1996).

### **2.3.- RESULTADOS**

Los porcentajes de mortalidad de las diferentes poblaciones para cada una de las concentraciones de cadmio estudiadas están representados en la figura 2.1. Las líneas representan, en cada gráfica, las predicciones del modelo GLIM obtenidas a partir de los datos observados. Como cabría esperar, la relación dosis-respuesta se ajusta bien a una forma sigmoide (típicamente en forma de S) en todas las cepas estudiadas. Esta tendencia es menos evidente en las poblaciones de P y A donde, tras la exposición a la máxima concentración de cadmio soluble en nuestras condiciones experimentales (aproximadamente 349 mg/L), no se supera el 75 y 70 % de mortalidad respectivamente.



**Figura 2.1.** Curvas de toxicidad de cadmio de las poblaciones SF (Br), SF, At, LMT(B), D, LMT(PD), P y A. Se observan los puntos de porcentaje de mortalidad obtenidos experimentalmente y la curva estimada obtenida mediante el modelo GliM.

En la tabla 2.5 se muestran las estimas y errores estándar de los parámetros  $\beta_0$  y  $\beta_1$ , punto de corte y pendiente de las curvas de mortalidad. En todos los casos se constata el buen ajuste del modelo utilizado con los datos experimentales, patente a partir de los valores de  $R^2$ .

**Tabla 2.5.** Parámetros estadísticos de las curvas de mortalidad.

	SF(Br)	SF	At	LMT(B)	D	LMT(PD)	P	A
$\beta_0$	-3,320	-3,359	-3,438	-3,256	-3,393	-4,381	-5,074	-3,379
ES ( $\beta_0$ )	0,2179	0,2061	0,2052	0,1988	0,1539	0,2716	0,3631	0,2326
$\beta_1$	0,0341	0,0249	0,0226	0,0181	0,0181	0,0197	0,0177	0,0119
ES ( $\beta_1$ )	0,00224	0,00154	0,00127	0,00109	0,00079	0,00112	0,00129	0,00088
DEV	120,9	113,1	79,2	112	233,9	105,6	163,3	138,7
	(106)	(94)	(94)	(94)	(190)	(94)	(94)	(94)
$R^2$	0,82	0,87	0,93	0,85	0,86	0,93	0,81	0,74

$\beta_0$  = punto de corte.  $\beta_1$  = pendiente. **ES** =error estándar. **DEV**= desviación obtenida por el modelo GliM para cada población. Entre paréntesis grados de libertad del modelo. **R<sup>2</sup>**=coeficiente de determinación

Como mencionamos en el apartado de material y métodos, para evaluar qué términos debía incluir el modelo GliM se analizaron, en sucesivos pasos, la influencia del factor placa (tabla 2.6), de la concentración, especie, población y la interacción entre la concentración y cada una de ellas. Como muestra la tabla 2.7, la inclusión de los términos fue reduciendo progresivamente la desviación del modelo de manera muy significativa, como se observa en el valor de la  $\chi^2$ , cuando se incluye el término ESPECIE y la interacción CONCENTRACIÓN X ESPECIES, sugiriendo un fuerte efecto de este factor en la respuesta a la exposición aguda del cadmio en nauplios de *Artemia*. Realizamos un análisis similar para evaluar la respuesta de las poblaciones de tres de las especies: *A. franciscana*, *A. salina* y *A. parthenogenetica* (tabla 2.8). En todas se observó un efecto significativo al ser considerado el factor población, aunque en la especie *A. parthenogenetica* el término de la interacción no resultó significativo. En la especie *A. persimilis* no se pudo realizar este análisis porque sólo disponíamos de una población.

A partir de los resultados obtenidos decidimos aplicar un modelo GliM, considerando cada población por separado.

**Tabla 2.6.** Análisis de la desviación del ajuste logístico que muestra efectos no significativos de la placa en el modelo completo y en cada una de las poblaciones estudiadas.

	<b>Desviación</b>	<b>gl<sup>a</sup></b>	<b>gl<sup>b</sup></b>	<b>□<sup>2</sup></b>	<b>P &gt; □<sup>2</sup></b>
Punto corte	5,180	875	--	--	--
Concentración	2,385	874	1	2,795	<0,0001
Población	1,203	867	7	1,182	<0,0001
Placa	1,202	866	1	1053	0,3049
<b>A. franciscana, SF(BR)</b>					
Punto de corte	482,9	107	--	--	--
Concentración	120,9	106	1	362,0	< 0,0001
Placa	119,6	105	1	1,331	0,2487
Concentración x placa	119,1	104	1	0,529	0,4672
<b>A. franciscana, SF</b>					
Punto de corte	549,7	95	--	--	--
Concentración	113,1	94	1	436,6	< 0,0001
Placa	110,3	93	1	2,723	0,0989
Concentración x Placa	109,4	92	1	0,965	0,3263
<b>A. salina, At</b>					
Punto de corte	664,1	95	--	--	--
Concentración	79,16	94	1	584,9	< 0,0001
Placa	78,13	93	1	1,035	0,3090
Concentración x Placa	74,47	92	1	3,662	0,0557
<b>A. salina, LMT(B)</b>					
Punto de corte	532,2	95	--	--	--
Concentración	112,0	94	1	420,1	< 0,0001
Placa	109,1	93	1	2,962	0,0853
Concentración x Placa	107,3	92	1	1,754	0,1854
<b>A. parthenogenetica, D</b>					
Punto de corte	1166,0	191	--	--	--
Concentración	233,9	190	1	932,2	< 0,0001
Placa	231,4	189	1	2,501	0,1138
Concentración x Placa	228,9	188	1	2,515	0,1128
<b>A. parthenogenetica, LMT(PD)</b>					
Punto de corte	749,9	95	--	--	--
Concentración	105,6	94	1	932,2	< 0,0001
Placa	102,4	93	1	3,237	0,0720
Concentración x Placa	101,9	92	1	0,447	0,5039
<b>A. parthenogenetica, P</b>					
Punto de corte	553,6	95	--	--	--
Concentración	163,3	94	1	390,2	< 0,0001
Placa	161,5	93	1	1,805	0,1791
Concentración x Placa	160,9	92	1	0,642	0,4231
<b>A. persimilis, A</b>					
Punto de corte	408,6	95	--	--	--
Concentración	138,7	94	1	269,9	< 0,0001
Placa	137,5	93	1	1,198	0,2738
Concentración x Placa	137,0	92	1	0,546	0,4599

gl<sup>a</sup> grados de libertad considerando el número de réplicas.

gl<sup>b</sup> grados de libertad del test.

**Tabla 2.7.** Análisis de la desviación del modelo logístico. Ajuste para los términos concentración, concentración +especie, concentración +población y la interacción de ambos términos.  $\chi^2$  =valor de la Chi-cuadrado con  $gl^1$ =grados de libertad del modelo y  $gl^2$ = grados de libertad del test

	DESVIACIÓN	$gl^1$	$gl^2$	$\chi^2$	$Pr>\chi^2$
$\chi^2_0$	5180	875	--	--	--
CONCENTRACIÓN	2385	874	1	2795	< 0,0001
ESPECIE	1569	871	3	816,1	< 0,0001
CONCENTRACIÓN X ESPECIE	1459	868	3	110,4	< 0,0001
POBLACIÓN	1203	867	7	1182	< 0,0001
CONCENTRACIÓN X POBLACIÓN	1067	860	7	136,7	< 0,0001

**Tabla 2.8.** Análisis de la desviación del modelo logístico considerando cada especie por separado. Ajuste para los términos concentración, concentración+población y la interacción de ambos términos.  $\chi^2$  valor de la Chi-cuadrado con  $gl^1$ = grados de libertad del modelo y  $gl^2$ =grados de libertad del test

<i>A. franciscana</i>					
	DESVIACIÓN	$gl^1$	$gl^2$	$\chi^2$	$Pr>\chi^2$
$\chi^2_0$	1033	203	--	--	--
CONCENTRACIÓN	320	202	1	712,6	< 0,0001
POBLACIÓN	245,7	201	1	74,5	< 0,0001
CONCENTRACIÓN X POBLACIÓN	234	200	1	117,8	< 0,0006
<i>A. salina</i>					
$\chi^2_0$	1207	191	--	--	--
CONCENTRACIÓN	216,7	190	1	989,9	< 0,0001
POBLACIÓN	198,5	189	1	18,3	< 0,0001
CONCENTRACIÓN X POBLACIÓN	191,2	188	1	7,3	< 0,0006
<i>A. parthenogenetica</i>					
$\chi^2_0$	2508	--	--	--	--
CONCENTRACIÓN	782,9	1726	1	1726	< 0,0001
POBLACIÓN	504,6	278,3	2	278,3	< 0,0001
CONCENTRACIÓN X POBLACIÓN	502,8	378	2	1,790	< 0,4086

Los contrastes por parejas para comparar las diferencias entre pendiente y punto de corte aparecen en la tabla 2.9 y los que comparan sólo las pendientes se muestran en la tabla 2.10. En el primer caso, los resultados muestran diferencias significativas entre la mayoría de las poblaciones excepto entre LMT(B) y D y At y SF. Mediante el estudio de los contrastes de las pendientes pudimos constatar que existen dos curvas muy diferentes que se sitúan en los dos extremos de susceptibilidad al cadmio; SF(Br), que ha resultado ser la más sensible en nuestro

estudio, y A, la más tolerante, y que poseen también pendientes claramente diferentes de las demás.

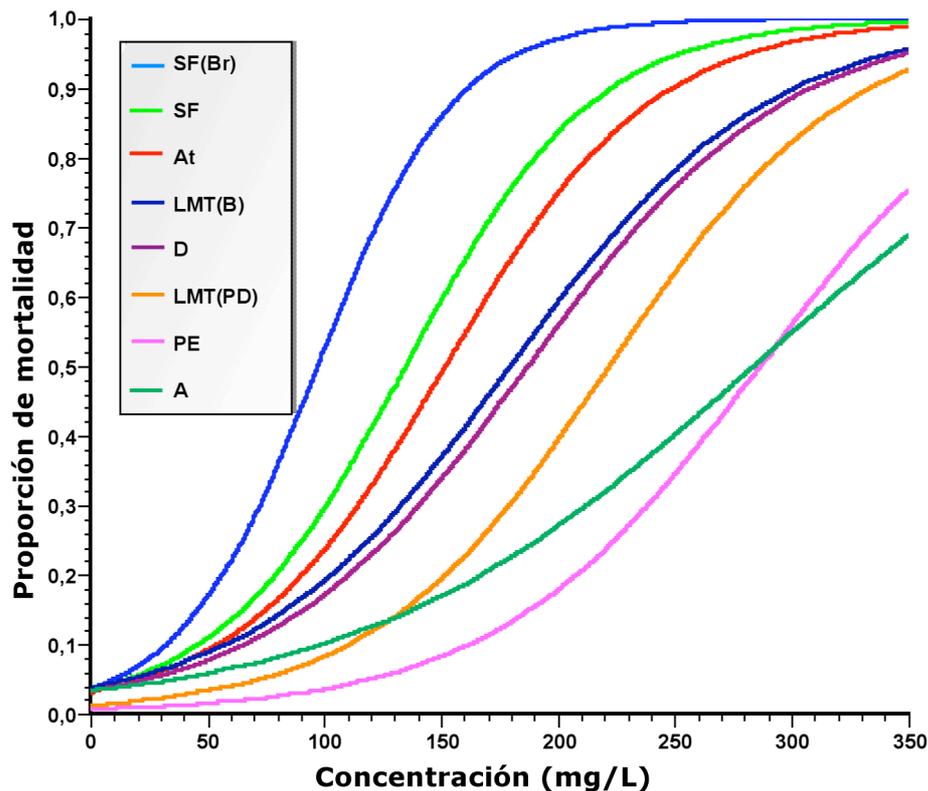
**Tabla 2.9.** Nivel de significación de las diferencias entre curvas de mortalidad obtenidas a partir del contraste por parejas considerando la pendiente y punto de corte. En todos los casos se aplicó la corrección de Bonferroni. (\*) representa diferencias significativas para un nivel de significación  $\alpha=0,05$ .

	SF (Br)	SF	At	LMT (B)	D	LMT (PD)	P
A <sup>b</sup>	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	6.6 .10 <sup>-3*</sup>
P	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	
LMT (PD)	0 *	0 *	0 *	7.3 .10 <sup>-8*</sup>	7.1 .10 <sup>-7*</sup>		
D	0 *	0 *	6.3.10 <sup>-10*</sup>	11.8			
LMT (B)	0 *	1.1 .10 <sup>-12*</sup>	7.9 .10 <sup>-5*</sup>				
At	0 *	0.13					
SF	0 *						

**Tabla 2.10.** Nivel de significación de las diferencias entre curvas de mortalidad obtenidas a partir del contraste por parejas considerando la pendiente. En todos los casos se aplicó la corrección de Bonferroni. (\*) representa diferencias significativas para un nivel de significación  $\alpha=0,05$ .

	SF (Br)	SF	At	LMT (B)	D	LMT (PD)	P
A <sup>b</sup>	0 *	4.3.10 <sup>-13*</sup>	2.5.10 <sup>-11*</sup>	2.5 .10 <sup>-4*</sup>	7.3 .10 <sup>-6*</sup>	6.2 .10 <sup>-7*</sup>	3.6 .10 <sup>-3*</sup>
P	2 .10 <sup>-9*</sup>	1 .10 <sup>-2*</sup>	2.8 .10 <sup>-1</sup>	22.9	22.1	7	
LMT (PD)	5.9 10 <sup>-8*</sup>	2.8 .10 <sup>-1</sup>	2.5	8.7	7		
D	1.2.10 <sup>-11*</sup>	1.5.10 <sup>-3*</sup>	6.2 .10 <sup>-2</sup>	27.7			
LMT (B)	4.2.10 <sup>-10*</sup>	7.6.10 <sup>-3*</sup>	2.8 10 <sup>-1</sup>				
At	1.3.10 <sup>-4*</sup>	7.3					
SF	1.7.10 <sup>-2*</sup>						

Para ilustrar estos resultados de una manera gráfica y con el fin de facilitar la comparación de la mortalidad de las poblaciones de *Artemia* estudiadas, en la figura 2.2 se muestra una gráfica con cada una de las curvas superpuestas y en diferente color. En esta figura se puede observar que las curvas de las distintas poblaciones se sitúan de izquierda a derecha según su sensibilidad al cadmio, siendo SF(Br) la más sensible y A, que se cruza con las demás, la más tolerante, junto con P.



**Figura 2.2.** Curvas de porcentaje de mortalidad de las poblaciones de *Artemia* estudiadas expuestas a concentraciones crecientes de cadmio, obtenidas mediante modelo Glim.

En la tabla 2.11 aparecen los valores de  $CL_{10}$ ,  $CL_{50}$ ,  $CL_{70}$  y LOEC de las poblaciones estudiadas. Los valores de  $CL_{50}$  oscilan entre 97,5 mg Cd/L, en la población de SF(Br), y 286,8 mg Cd/L en P y 284,4 mg Cd/L en A. Esto supone que P y A presentan  $CL_{50}$  aproximadamente tres veces superiores que SF(Br). Como se puede observar, las diferencias entre poblaciones son más importantes a

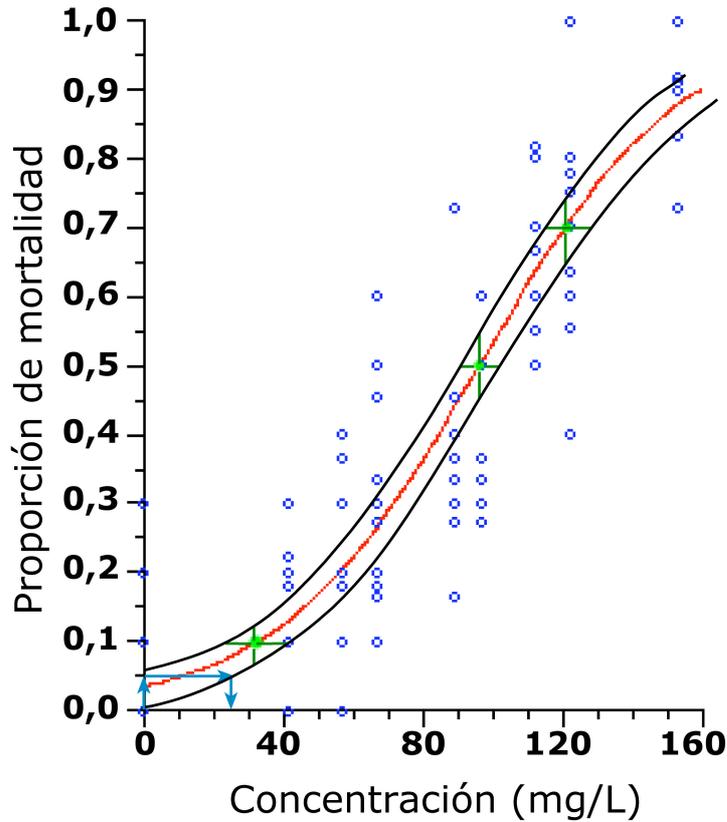
concentraciones bajas de exposición, ya que las diferencias son mayores en la CL<sub>10</sub> que en la CL<sub>70</sub>. Podemos observar, también, que los intervalos de confianza son algo más amplios que los calculados para la CL<sub>50</sub>. Los valores de CL<sub>70</sub> calculados guardan la misma relación entre la población más sensible y las más tolerantes que la observada en la CL<sub>50</sub>, mientras que los valores de CL<sub>10</sub> de la cepa más tolerante es algo mayor que 5 veces el valor de la más sensible.

La población de SF (Br) posee valores de CL<sub>50</sub>, CL<sub>10</sub> y CL<sub>70</sub> con intervalos de confianza que no se solapan con los del resto de poblaciones.

Los valores de CL<sub>10</sub> y CL<sub>70</sub> ponen de manifiesto diferencias entre poblaciones que no podemos detectar teniendo en cuenta solamente el valor de CL<sub>50</sub>.

**Tabla 2.11.** Valores de CL<sub>10</sub>, CL<sub>50</sub>, CL<sub>70</sub> a las 24 horas y respectivos límites de confianza (95%) 24 h en nauplios *instar II* de diferentes poblaciones de *Artemia*, expresados en mg/L de cadmio, y valores de LOEC obtenidos mediante método gráfico basado en metodología GliM.

	CONCENTRACIÓN LETAL (mg/l)						
	CL <sub>50</sub>	I.C.	CL <sub>10</sub>	I.C.	CL <sub>70</sub>	I.C.	LOEC
SF(Br)	97,5	93,3-101,8	33,0	23,2-40,7	122,4	117,1-128,6	23
SF	135,1	128,5-142,0	46,7	34,2-57	169,1	161,1-178,6	35
At	152,1	144,4-160,0	54,9	41,0-66,5	189,6	181,0-199,3	47
LMT(B)	180,1	171,1-189,6	58,6	41,4-72,7	227,0	216,1-239,6	59
D	187,5	181,0-194,0	66,1	53,5-76,9	234,3	226,6-242,7	40
LMT(PD)	222,6	213,0-232,2	111,0	93,3-125,7	265,7	255,6-276,7	85
P	286,8	277,7-296,5	162,6	141,6- 179,0	334,7	323,2-348,8	125
A	284,4	271,4-298,9	99,5	70,6-121,9	355,7	337,8-378,2	100



**Figura 2.3.** Curvas de toxicidad de cadmio de la población SF(Br). En verde los valores de  $CL_{10}$ ,  $CL_{50}$  y  $CL_{70}$  y los IC 95% de cada uno de ellos. En horizontal los IC de la concentración y en vertical los IC de la proporción de mortalidad. Las flechas azules indican el proceso de obtención de LOEC de manera gráfica.

Otro de los parámetros ampliamente usados en toxicología es la menor concentración a la que se observa efecto significativo con respecto al grupo control (LOEC). Aunque algunos autores (Suter y Rosen, 1988; Rand, 1995) han apuntado que esta medida es arbitraria, porque depende directamente de las concentraciones seleccionadas en el diseño experimental y por el hecho de que no posee límites de confianza. En el presente trabajo, hemos realizado las estimas de LOEC mediante un método gráfico, de manera similar a como se comparan intervalos de confianza de dos medias que no se solapan. Esta aproximación es conservativa porque dos medias con intervalos de confianza que no se solapan son siempre

significativamente diferentes. Este método propone la obtención de la LOEC a partir de la línea horizontal desde el IC (intervalo de confianza) superior (95%) de la concentración 0 que cruza con la banda de confianza derecha (95%) del modelo. En la figura 4 podemos observar, a modo de ejemplo, cómo se obtiene mediante el método gráfico el valor de LOEC para la curva de toxicidad correspondiente a SF(Br). En la tabla 2.11 se recogen estos valores que oscilan entre los 23 mg Cd/L de SF(Br) y los 125 mg Cd/L de P, existiendo, en este caso también, una relación de 5 a 1 entre la población más sensible y la más tolerante.

## 2.4.- DISCUSIÓN

*Artemia* es uno de los crustáceos más tolerantes al cadmio, como se puede deducir de los valores de  $CL_{50}$  de 24 h obtenidos en el presente trabajo, que varían entre 98 a 286 mg/L. Estos valores pueden ser comparados con los mencionados por Eisler (1971) en crustáceos para la  $CL_{50}$  a las 48 h y que varían entre 0,5 y 17 mg/l. Esta tolerancia puede ser en parte explicada por la gran efectividad del cadmio en la inducción de metalotioneínas en *Artemia* y que será tratada con mayor detalle en el capítulo 4. Martínez (1996) encontró que *A. parthenogenética*, LMT(PD), presentaba una relación molar MT/Cd de 2, al menos un orden de magnitud mayor que la encontrada en otros crustáceos.

Al incluir el factor especie en el análisis del modelo GliM, disminuyó considerablemente la desviación, lo cual sugiere un potente efecto de la especie en la respuesta. Esta respuesta consistente y homogénea de la especie, a pesar de las diferencias en origen geográfico y hábitat de las poblaciones consideradas dentro de cada una de ellas, parece indicar que existe un importante componente genético en la respuesta aguda de los nauplios de *Artemia* frente a la exposición tóxica del cadmio.

Por otro lado, el hecho de que existan diferencias de sensibilidad entre poblaciones pertenecientes a la misma especie, como entre SF y SF(Br), incluso mayores que las encontradas entre poblaciones de especies diferentes (LMT(B) y D) parece sugerir que junto a la tolerancia intrínseca, específica del género/especie

debe existir un componente de tolerancia específico de cada población, determinado por diferentes factores como el modo de reproducción, ploidía o particularidades del hábitat, tal como se ha encontrado en otros invertebrados (Calow y Sibly, 1990; Donker y Bogert, 1991; Donker *et al.*, 1993).

Las diferencias encontradas entre las pendientes de las curvas de mortalidad, por ejemplo, requieren un análisis detallado. La interpretación del significado de la pendiente de las curvas de toxicidad difiere según los autores. Desde un punto de vista toxicológico, se asume que la pendiente de la curva de toxicidad representa una respuesta uniforme para todos los organismos de una especie/población y su forma está relacionada con el mecanismo de toxicidad. Una pendiente suave (poco acusada), indicaría una absorción lenta, una toxicidad retrasada o una rápida excreción o destoxificación, mientras que, por el contrario, una pendiente acusada indicaría una rápida absorción, un efecto rápido o una excreción o destoxificación lenta (Rand *et al.*, 1995). Una aproximación poblacional la relaciona con la variabilidad intraespecífica, tal y como sugieren Møller *et al.* (1996), de forma que cuanto más pronunciada sea la pendiente de la curva de toxicidad existe una mayor uniformidad en la respuesta, mientras que una pendiente más suave indicaría una mayor variabilidad en dicha respuesta.

Creemos que es más adecuada la aproximación poblacional para este tipo de curvas, porque la información que se pretende obtener con el análisis toxicológico requeriría de otro tipo de estudios, como por ejemplo los relacionados con la cinética de acumulación y eliminación del cadmio.

También, desde un enfoque poblacional, coincidimos con Evenden y Depledge (1997) al considerar que la forma sigmoide de la curva indica cómo en una población de individuos, las dosis más bajas de un compuesto provocan inicialmente una respuesta sólo en los organismos más susceptibles dentro de la población. Conforme la dosis aumenta, responderán más individuos y, a dosis altas, sólo los individuos más resistentes estarán disponibles para responder. De esta manera, la pendiente de la curva concentración-mortalidad proporciona información sobre la variación fenotípica dentro de la población, incluyendo variación genética y ambiental (Chilcutt y Tabashnik, 1995). Teniendo en cuenta que las poblaciones se

han obtenido a partir de la eclosión de quistes recolectados directamente de su medio natural, la pendiente de las curvas de mortalidad estaría describiendo (o sería reflejo de) la variación natural de las poblaciones para este rasgo fisiológico y, por tanto, la variabilidad de las poblaciones frente a la exposición aguda del cadmio quedaría bien descrita a través de ellas.

Algunos autores han intentado relacionar la variabilidad en la mortalidad tras la exposición tóxica con el modo de reproducción (Møller *et al.*, 1996). En nuestro caso, no encontramos que las poblaciones bisexuales presentaran una mayor variabilidad de respuesta ya que SF(Br) presenta la pendiente más acusada, la pendiente de A es la más suave, y ambas presentan reproducción sexual.

Es interesante destacar las diferencias significativas encontradas en la pendiente de las dos poblaciones de *A. franciscana*, SF(Br) y SF. La población de Macau (Brasil) procede de una inoculación de quistes procedentes de San Francisco Bay y, como se ha sugerido, posiblemente se ha adaptado a las altas temperaturas de ese nuevo medio (Vanhaecke *et al.*, 1984). Existen, por tanto, razones para pensar que la población de SF(Br) sea el producto de un "cuello de botella" después de sufrir la selección a altas temperaturas en su nuevo habitat. SF(Br) además de poseer una pendiente mayor que SF (lo cual indicaría una menor variabilidad de respuesta), es más sensible al cadmio como se ve por el menor valor de CL<sub>50</sub> obtenido (tabla 2.11), lo cual está de acuerdo con la hipótesis de Gillespie y Guttman, (1999), que afirma que una disminución de la variabilidad puede reducir el potencial adaptativo de una población para sobrevivir a un nuevo estrés medioambiental.

La distinta la tolerancia al cadmio entre SF y SF(Br) ya había sido constatada por otros autores de forma independiente y bajo condiciones de experimentación diferentes (Trieff, 1980; Freeman *et al.*, 1987). Sin embargo, la especie *A. franciscana* parece ser muy "plástica" respecto a otros factores, como salinidad y temperatura (Browne y Wanigasekera, 2000).

*A. persimilis* se encuentra en el lado opuesto del rango de variabilidad de respuesta que *A. franciscana* y muestra la mayor tolerancia al cadmio. Además en

otros estudios ha mostrado el mayor rango de temperatura-salinidad de las cuatro especies estudiadas en el presente trabajo (Browne y Wanigasekera, 2000).

Por otro lado, contrariamente a lo esperado, las tres poblaciones de *A. parthenogenetica* no mostraron una respuesta de mortalidad más homogénea que las poblaciones bisexuales de *A. franciscana* y *A. salina*, como se puede apreciar a partir sus respectivas pendientes. Algunos autores como Browne y Hoopes (1990) han descrito una composición policlonal de algunas poblaciones naturales de *A. parthenogenetica*, que podría ser la respuesta a una alta variabilidad fenotípica.

Considerando las poblaciones en su conjunto podríamos afirmar que las especies partenogenéticas presentan mayor tolerancia al cadmio que las bisexuales *A. franciscana* y *A. salina*, lo cual podría reforzar la hipótesis generalista (Lynch, 1984). El éxito de la distribución en hábitats adversos de organismos partenogenéticos, comparados con las poblaciones bisexuales directamente emparentadas, abrió el debate sobre las ventajas de la reproducción asexual y plantearon en los años 80 la hipótesis de que los organismos partenogenéticos poseen genotipos "ampliamente adaptados" o generalistas (Lynch y Gabriel, 1983; Lynch, 1984). Estos autores afirman que las poblaciones partenogenéticas, a menudo, necesitan menos requerimientos específicos en su hábitat, con amplios rangos de tolerancia para gradientes bióticos y fisicoquímicos relevantes, lo que les permite ocupar áreas periféricas y amplios rangos geográficos, con lo cual les han atribuido una mayor tolerancia general a numerosos factores.

Sin embargo, a la vista del grado de tolerancia al cadmio que presenta la especie bisexual *A. persimilis* (A), similar a la de la población de *A. parthenogenética* (P), nuestros resultados, como los de Browne y Wanigasekara (2000), no pueden confirmar esta hipótesis.

Por otro lado, contrariamente a los estudios relacionados con el significado adaptativo de la poliploidía (Zhang y King, 1993), nuestras experiencias de toxicidad tampoco confirman un patrón consistente de superioridad de las poblaciones asexuales poliploides frente a las diploides. La población diploide de *A.*

*parthenogenética*, LMT(PD), mostró una mortalidad intermedia a la de las dos poblaciones teraplóides (D y P).

Otra consideración importante, relacionada con las poblaciones que conforman la especie *A. parthenogenetica*, es la que apuntan Sun *et al.* (1999) en relación con los diferentes caminos evolutivos de las poblaciones de lagunas y lagos salados costeros e interiores. La utilización de marcadores genéticos, como los AFLP (Amplified fragment-length polymorphism), han permitido el establecimiento de las relaciones genéticas existentes entre numerosas poblaciones de *Artemia* pertenecientes a una misma especie (por ejemplo, en las poblaciones bisexuales de *Artemia*) (Triantaphyllidis *et al.*, 1997). Además ha permitido especular sobre las relaciones evolutivas entre las distintas especies que componen el género *Artemia*. En el trabajo de Sun *et al.* (1999), estas técnicas han detectado diferencias genéticas significativas (en términos de distancias genéticas) entre poblaciones de *A. parthenogenetica* de origen costero e interior, diferencias que fueron incluso mayores que las encontradas entre las especies americanas *A. franciscana* y *A. persimilis*. Gao (1994) citado en Sun *et al.* (1999), encontró también que existían diferencias significativas entre isoenzimas pertenecientes a poblaciones de salinas costeras e interiores de China.

Por medio del análisis de marcadores AFLP, también se han detectado diferencias genéticas entre las especies americanas *A. persimilis* y *A. franciscana*, con distancias genéticas mayores que las encontradas entre dos poblaciones de *A. parthenogenética* y *A. urmiana* (Sun *et al.*, 1999) y la entidad de las poblaciones bisexuales de *Artemia* del Mediterráneo como grupo independiente del resto de poblaciones bisexuales, que ha sido también corroborado por experimentos de retrocruzamientos, y estudios morfológicos (Abreu-Grobois, 1987; Triantaphyllidis *et al.*, 1998).

A y P muestran mayor tolerancia al cadmio que el resto de poblaciones estudiadas, con valores de CL<sub>50</sub> de 285 mg/L. Ambas poblaciones habitan lagunas interiores que presentan altas concentraciones relativas de sulfato y magnesio (Angelelli *et al.*, 1976), mientras las lagunas costeras poseen proporciones de estos iones semejantes a las de las evaporitas marinas (Barata, 1994). Como ya se ha

descrito en algunos trabajos (Bowen *et al.*, 1988), *Artemia* presenta ejemplos de adaptaciones únicas a determinadas concentraciones/composiciones iónicas del medio. La adaptación de *Artemia* a las composiciones iónicas de salinas interiores de medios extremos, concentraciones iónicas especiales y únicas, puede haber determinado un manejo especial de los cationes divalentes, confiriendo a estas poblaciones una mayor tolerancia al cadmio. Recientemente Browne y Wanigasekera (2000) encontraron que *A. persimilis* presenta el rango más amplio de tolerancia para la combinación temperatura-salinidad al ser comparada con las especies estudiadas por nosotros y que estos autores relacionan con las grandes fluctuaciones estacionales y/o diurnas en la combinación salinidad-temperatura en su hábitat natural.

La respuesta letal al cadmio de los nauplios de P y A constituyen un ejemplo de las limitaciones del valor  $CL_{50}$  para comparar la toxicidad de una sustancia sobre distintos organismos. Así, ambas poblaciones presentan, prácticamente, el mismo valor de  $CL_{50}$  mientras las curvas de mortalidad son, sin embargo, diferentes en los valores de  $CL_{10}$  y  $CL_{70}$ . Como se puede apreciar en la figura 2.2, ambas curvas se cruzan justo en torno al valor de  $CL_{50}$  pero sus curvas son significativamente diferentes, tanto en la pendiente como en el punto de corte. En este sentido, debemos afirmar que utilizar el valor de  $CL_{50}$  para comparar el comportamiento de las distintas poblaciones de *Artemia* es insuficiente, siendo necesario estudiar las curvas en su conjunto para éste propósito. El uso de los valores de  $CL_{50}$  debe ser considerado de utilidad relativa para comparar toxicidad aunque aún son utilizados, en cierta medida, para el establecimiento de valores límite en la legislación ambiental sobre vertidos de sustancias contaminantes (Hairston, 1996; Evenden y Depledge, 1997).

Cuando comparamos los valores de  $CL_{50}$  24 horas de cadmio en los nauplios de las poblaciones del *Artemia* estudiadas en conjunto, con valores de  $CL_{50}$  correspondientes a otros crustáceos, encontramos que *Artemia* se encuentra entre los crustáceos más tolerantes al cadmio (tabla 2.12).

En la tabla 2.12 se pone de manifiesto lo difícil que resulta la comparación de los resultados obtenidos en los estudios de toxicidad, debido a la diferente duración de

los tests y los diferentes estados de desarrollo de los animales de experimentación. La mayoría de las referencias de crustáceos aportan valores de  $CL_{50}$  de cadmio obtenidos tras 48 horas de exposición por lo que es muy difícil la comparación con nuestros resultados.

Las diferencias de tolerancia al cadmio en *Artemia*, en nuestro estudio, son pequeñas (dentro del mismo orden de magnitud) en comparación a las encontradas por Baird *et al.* (1990) en distintos clones de *Daphnia* para el mismo tóxico, con diferencias de tres órdenes de magnitud, aunque son similares a las nuestras en otros trabajos posteriores (Barata *et al.*, 1998).

En la evaluación de la toxicidad de otras sustancias, en las mismas poblaciones de *Artemia* que las del presente trabajo, se encontraron grandes diferencias de respuesta frente a la exposición, dependiendo del tóxico considerado. Así ocurre en el caso del pesticida organofosforado Chloropyrifós con diferencias de un orden de magnitud (Varo *et al.*, 1998), mientras que en el caso del pesticida organoclorado Endosulfan las diferencias fueron similares a las nuestras (Varó *et al.*, 1997).

La variación intrapoblacional en la respuesta letal de *Artemia* ante la exposición aguda a cadmio refleja la diversidad intrínseca de cada población puesto que los quistes eclosionados procedían directamente de su hábitat natural. Dado que los bancos de quistes constituyen una reserva ecológica y evolutiva potencialmente utilizable en caso de cambio medioambiental (Hairston, 1996), es de esperar que aquellas poblaciones que muestren una mayor variabilidad fenotípica en la respuesta letal al cadmio y una mayor tolerancia, poseerán una mayor ventaja para enfrentarse a un episodio catastrófico potencial de contaminación por cadmio. Esto puede ser especialmente relevante en el caso de poblaciones simpátricas de *Artemia*, como es el caso de LMT(PD), que posee mayor valor de  $CL_{50}$  (mayor tolerancia) y mayor variabilidad de respuesta que LMT(B).

Por último, hay que resaltar la importancia de la metodología estadística aplicada en la descripción de la variabilidad fenotípica en cuanto a la respuesta letal al cadmio de las poblaciones naturales de *Artemia*.

**Tabla 2.12.** Estudios de toxicidad aguda de cadmio en diferentes especies de crustáceos

Especie	Medio	Estado de desarrollo	Tiempo (horas)	CL <sub>50</sub> (mg Cd/L)/	Referencia
<i>Paragrassus quadridentatus</i>	¿	¿	168	14	Ahsanulla, 1976 (Wright y Welbourn, 1994)
<i>Palaemon</i> sp	Marino	¿	120	2,3	
<i>Patiriella exigua</i>	¿	¿	96	> 10	
<i>Daphnia magna</i> Straus	Dulceacuícola	Nauplios 24 h	48	24-233	(Barata <i>et al.</i> , 1998)
<i>Daphnia magna</i> Straus	Dulceacuícola	Nauplios 24 h	48	0,6-116	(Baird <i>et al.</i> , 1990)
<i>Daphnia magna</i> Straus	Dulceacuícola	Nauplios 24 h	48	4-116	(Baird <i>et al.</i> , 1991)
<i>Procambarus Clarkii</i>	Dulceacuícola	Adultos	96	18,4-58,5	(Del Ramo <i>et al.</i> , 1987)
<i>Artemia parthenogenetica</i> (LMT(PD)) y <i>Procambarus clarkii</i>	Salino y dulceacuícola respectivamente	Adultos	96	43	(Del Ramo <i>et al.</i> , 1995)
<i>A. franciscana</i> (población Bahía de San Francisco)	Salino	Nauplios?	24	58	
<i>A. franciscana</i> (población Bahía de San Francisco)	Salino	Nauplios?	24	100	(Freeman <i>et al.</i> , 1987)
<i>Callinectes sapidus</i>	Marino?	Juveniles	504	0,019-0,186	(Guerin, 1995)
<i>Daphnia pulex</i>	Dulceacuícola	Nauplios 24 h	48	0,078	(Roux <i>et al.</i> , 1993)
<i>Hyalella azteca</i>	Dulceacuícola	¿	96	0,190	Schlecat <i>et al.</i> , 1979 (Wright y Welbourn, 1994)
<i>Gammarus pulex</i>	Dulceacuícola	Adultos?	48	0,300	
<i>Gammarus pulex</i>	Dulceacuícola	Adultos?	48	1,1	(Stuhlbacher y Maltby, 1992)
<i>Daphnia magna</i> Straus (dos clones)	Dulceacuícola	Nauplios neonatos	48	0,025-0,129	(Stuhlbacher y Maltby, 1992)
<i>Acartia tonsa</i>	Marino	¿	96	0,029	Toudal y Riisgard, 1987 (Wright y Welbourn, 1994)
<i>A. franciscana</i> (población brasileña de Macau)	Salino		24	60	(Trieff, 1980)
<i>Mysidopsis bahia</i>	Marino	¿	96	0,028	Voyer y Modica, 1990 (Wright y Welbourn, 1994)

## 2.5.- BIBLIOGRAFIA

- Abreu-Grobois, F. A. (1987). A review of the genetics of *Artemia*. *Artemia Research and its Applications*. Sorgeloos, P. y Bengtson, D. A. Wetteren, Universa Press. **1**: 61-99.
- Angelelli, V., Schalamuk, I. y Arrospide, A. (1976). Los yacimientos no metalíferos y rocas de aplicación de la región Patagónica-Comahue. Anales XVII., Ministerio de Economía República Argentina.: 144.
- Baird, D. J., Barber, I., Bradley, M., Soares, A. M. V. M. y Calow, P. (1991). "A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **21**: 257-265.
- Baird, D. J., Barber, I. y Calow, P. (1990). "Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. I. Chronic life-history effects." *Functional Ecology* **4**: 399-407.
- Barata, C. (1994). Caracterización ecológica de las poblaciones españolas de *Artemia*: Estrategias reproductivas y competencia. Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal. Tesis Doctoral. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Castellón (Valencia).
- Barata, C., Baird, D. J. y Markich, S. J. (1998). "Influence of genetic and environmental factors on the tolerance of *Daphnia magna* Straus to essential and non-essential metals." *Aquatic Toxicology* **42**: 115-137.
- Borowitz, J. L. y McLaughlin, J. L. (1992). "Evidence for calcium channels in brine shrimp: diltiazem protects shrimp against cadmium." *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology* **48**: 435-440.
- Bowen, S. T., Buoncristiani, M. R. y Carl, J. R. (1988). "*Artemia* habitats: Ion concentrations tolerated by one superspecies." *Hydrobiologia* **158**: 201-214.
- Brown, B. y Ahsanullah, M. (1971). "Effect of heavy metals on mortality and growth." *Marine Pollution Bulletin* **2**(12): 182-187.
- Browne, R. y Wanigasekera, G. (2000). "Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **244**: 29-44.
- Browne, R. A. (1980). "Acute responses versus reproductive performance in five strains of brine shrimp exposed to copper sulphate." *Marine Environmental Research* **3**: 185-193.
- Browne, R. A. y Hoopes, C. W. (1990). "Genotype diversity and selection in asexual brine shrimp (*Artemia*)." *Evolution* **44**(4): 1035-1051.
- Calow, P. y Sibly, R. M. (1990). "A physiological basis of population processes; ecological implications?" *Functional Ecology* **4**: 283-288.
- Chilcutt, C. F. y Tabashnik, B. E. (1995). "Evolution of pesticide resistance and slope of the concentration-mortality line: are they related?" *Journal of Economic Entomology* **88**(1): 11-20.

- Cohen, R. G., Amat, F., Hontoria, F. y Navarro, J. C. (1999). "Preliminary characterization of some argentinean *Artemia* populations from La Pampa and Buenos Aires provinces." *International Journal of Salt Lake Research* **8**: 329-340.
- Del Ramo, J., Díaz Mayans, J., Torreblanca, A. y Nuñez, A. (1987). "Effects of temperature on the acute toxicity of heavy metals (Cr, Cd and Hg) to freshwater crayfish *Procambarus clarkii* (Girard)." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **38**: 736-741.
- Del Ramo, J., Martínez, M., Pastor, A., Torreblanca, A. y Diaz-Mayans, J. (1993). "Effect of Cadmium Pre-Exposure in Cadmium Accumulation by Brine Shrimp *Artemia*.- Involvement of Low-Molecular-Weight Cadmium-Binding Ligands." *Marine Environmental Research* **35**(1-2): 29-33.
- Del Ramo, J., Torreblanca, A., Martínez, M., Pastor, A. y Diaz-Mayans, J. (1995). "Quantification of Cadmium-Induced Metallothionein in Crustaceans by the Silver-Saturation Method." *Marine Environmental Research* **39**: 121-125.
- Donker, M. H. y Bogert, C. G. (1991). "Adaptation to cadmium in three populations of the isopod *Porcellio scaber*." *Comparative Biochemistry and Physiology* **100C**(1-2): 143-146.
- Donker, M. H., Zonneveld, C. y Van Straalen, N. M. (1993). "Early reproduction and increased reproductive allocation in metal-adapted populations of the terrestrial isopod *Porcellio scaber*." *Oecologia* **96**: 316-323.
- Eisler, R. (1971). "Cadmium poisoning in *Fundulus heteroclitus* (Pisces: Cyprinodontidae) and other marine organisms." *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **28**: 1225-1234.
- Evenden, A. J. y Depledge, M. H. (1997). "Genetic susceptibility in ecosystems: the challenge for ecotoxicology." *Environmental Health Perspectives* **105**(4): 849-854.
- Forbes, V. E., Møller, V., Browne, R. A. y Depledge, M. H. (1999). The influence of reproductive mode and its genetic consequences on the responses of populations to toxicants: a case study. *Genetics and Ecotoxicology*. Forbes, V. E., Taylor & Francis: 187-206.
- Freeman, B. L., Berstein, R. L. y Bowen, S. T. (1987). Selenium toxicity in two populations of *Artemia franciscana*. *Artemia Research and its Applications*. Sorgeloos, P., Bengston, D. A., Declair, W. y Jasper, E. Wetteren, Belgium, Universa Press. **1**: 324-330.
- Ghaheri, M., Baghal-Vayjooee, M. H. y Naziri, J. (1999). "Lake Urmia, Iran: a summary review." *International Journal of Salt Lake Research* **8**: 19-22.
- Giesy, J. P. y Graney, R. L. (1989). "Recent developments in and intercomparisons of acute and chronic bioassays and bioindicators." *Hydrobiologia* **188**(189): 21-60.
- Gillespie, R. B. y Guttman, S. I. (1999). Chemical-induced changes in the genetic structure of populations: effects on allozymes. *Genetics and Ecotoxicology*. Forbes, V. E., Taylor & Francis: 55-77.

- Goering, P. L., Waalkes, M. P. y Klaasen, C. D. (1995). Toxicology of cadmium. Toxicology of metals: biochemical aspects. Handbook of Experimental pharmacology. Goyer, R. A. y Cherian, M. G. New York, Springer-Verlag. **115**: 189-213.
- Guerin, J. L. (1995). "Effects of cadmium on survival, osmoregulatory ability and bioenergetics of juvenile blue crabs *Callinectes sapidus* at different salinities." *Marine Environmental Research* **40**(3): 227-246.
- Hairston, N. G. (1996). "Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments." *Limnology and Oceanography* **41** (5): 1087-1092.
- Jung, K. D. (1975). Etude bibliographique de la sensibilité des crustacés utilisés (*Daphnie, Gammare, Artemia*) vis à vis des produits chimiques. AOUT-Septembre 1975, Centre Belge d'Etude et de Documentation des Eaux.
- Kerr, D. R. y Meador, J. P. (1996). "Modeling dose-response using generalized linear models." *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(3): 395-401.
- Kissa, E., Moraitou-Apostolopoulou, M. y Kiortsis, V. (1984). "Survival and hatching rate of *Artemia salina* (L.)." *Archives für hydrobiologie* **102**(2): 137-153.
- Lavens, P. y Sorgeloos, P. (2000). "The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture." *Aquaculture* **181**: 397-403.
- Lynch, M. (1984). "Destabilizing hybridization, general-purpose genotypes and geographic parthenogenesis." *The Quarterly Review of Biology* **59**: 257-290.
- Lynch, M. y Gabriel, W. (1983). "Phenotypic evolution and parthenogenesis." *The American Naturalist* **122**(6): 745-764.
- Martinez, M. (1989). "Toxicidad, bioacumulación y presencia de proteínas semejantes a metalotioneínas inducidas por cadmio en *Artemia salina*". Departamento de Biología Animal. Tesis de Licenciatura. Universidad de Valencia. Valencia.
- Martinez, M. (1996). "Estudio del papel de las metalotioneínas en la fisiología de los metales en crustáceos". Departamento de Biología Animal. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. Valencia.
- Møller, V., Forbes, I. J. y Depledge, M. (1996). "Population responses to acute and chronic cadmium exposure in sexual and asexual estuarine gastropods." *Ecotoxicology* **5**: 313-326.
- Parker, K. R., Maki, A. W. y Harner, E. J. (1999). "There is no need to be normal: Generalized linear models of natural variation." *Human and Ecological Risk Assessment* **5**(2): 355-374.
- Piegorsch, W.W. y Bailer, A.J. (1997). Introduction to generalized linear models. Statistics for Environmental Biology and Toxicology. Chapman & Hall.
- Rand, G. M. (1995). Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment., Taylor & Francis.
- Rand, G. M., Wells, P. G. y McCarty, L. S. (1995). Introduction to Aquatic Toxicology. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. Rand, G. M., Taylor & Francis.

- Roux, D. J., Kempster, P. L., Truter, E. y Van der Merwe, L. (1993). "Effect of cadmium and copper on survival and reproduction of *Daphnia pulex*." *Water SA* **19**(4): 269-274.
- Sleet, R. B. y Brendel, K. (1985). "Homogeneous populations of *Artemia* nauplii and their potential use for in vitro testing in developmental toxicology." *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* **5**: 41-54.
- Stuhlbacher, A. y Maltby, L. (1992). "Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L.)." *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology* **22**(3): 319-324.
- Sun, Y., Song, W., Zhong, Y., Zhang, R., Abatzopoulos, T. J. y Chen, R. (1999). "Diversity and genetic differentiation in *Artemia* species and populations detected by AFLP markers." *International Journal of Salt Lake Research* **8**: 341-350.
- Suter, G. W. y Rosen, A. E. (1988). "Comparative Toxicology for risk assessment of marine fishes and crustaceans." *Environmental Science and Technology* **22**(5): 548-556.
- Taher, A. G. y Soliman, A. A. (1999). "Heavy metal concentrations in surficial sediments from Wadi El Natrun saline lakes, Egypt." *International Journal of Salt Lake Research* **8**: 75-92.
- Taylor, P. L., Hutchinson, L. A. y Muir, M. K. (1980). "Heavy metals in the Great Salt Lake, Utah." *Utah Geological and mineral Survey* **116**: 195-200.
- Triantaphyllidis, G., Abatzopoulos, T. y Sorgeloos, P. (1998). "Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostracea)." *Journal of Biogeography* **25**: 213-226.
- Triantaphyllidis, G., Criel, G. R. J., Abatzopoulos, T. J., Thomas, K. M., Peleman, J., Beardmore, J. A. y Sorgeloos, P. (1997). "International Study on *Artemia*. LVII. Morphological and molecular characters suggest conspecificity of all bisexual European and North African *Artemia* populations." *Marine Biology* **129**: 477-487.
- Trieff, N. M. (1980). Toxicity of heavy metals, oils and other organics on *Artemia*. *The Brine Shrimp Artemia*. G. Persoone, P. S., O. Roels, and E. Jaspers. Wetteren, Belgium, Universa Press. **1**: 253-262.
- UNEP/FAO/IAEA (1987). Test of the acute lethal toxicity of pollutants to marine fish and invertebrates, UNEP/FAO/IAEA.
- UNEP/FAO/IAEA (1989). Estimation of the toxicity of pollutants to marine phytoplanktonic and zooplanktonic organisms., UNEP/FAO/IAEA.
- UNEP/FAO/IAEA (1989). Test of the acute lethal toxicity of pollutants to marine fish and invertebrates, UNEP/FAO/IAEA.
- Vanhaecke, P., Siddall, S. E. y Sorgeloos, P. (1984). "International study on *Artemia*. XXXII. Combined effects of temperature and salinity on the survival of *Artemia* of various geographical origin." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **80**: 259-275.

- Varó, I., Serano, R., Navarro, J. C., Lopez, F. J. y Amat, F. (1998). "Acute lethal toxicity of the organophosphorus pesticide chlorpyrifos to different species and strains of *Artemia*." *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology* **61**: 778-785.
- Varo, I., Taylor, A. C. y Amat, F. (1998). "The effects of temperature and oxygen tension (PO<sub>2</sub>) on the oxygen consumption rates of adults of different *Artemia* strains." *Comparative Biochemistry and Physiology* **120**(Part A): 385-390.
- Varó, I., Taylor, A. C., Ferrando, M. D. y Amat, F. (1997). "Effect of endosulfan pesticide on the oxygen consumption rates of nauplii of different spanish strains of *Artemia*." *Journal of Environmental Science and Health* **B32**(3): 363-375.
- Verripoulos, G., Moraitou-Apostolopoulou, M. y Milliou, E. (1987). "Combined toxicity of four toxicants (Cu, Cr, oil, oil dispersant) to *Artemia salina*." *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*. **38**: 483-490.
- Wright, D. A. y Welbourn, P. M. (1994). "Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota." *Environmental Reviews* **2**: 187-214.
- Zhang, L. y King, C. E. (1993). "Life history divergence of sympatric diploid and polyploid populations of brine shrimp *Artemia parthenogenetica*." *Oecologia* **93**: 177-183.



# 3

## ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN/ELIMINACIÓN DE CADMIO EN LAS POBLACIONES DE *Artemia*

### 3.1.- INTRODUCCIÓN

Los líquidos corporales de todos los animales difieren en su composición de agua y solutos con respecto al ambiente que les rodea. Los animales están en desequilibrio con su entorno y, para mantenerlo, deben emplear mecanismos de intercambio en contra de gradiente, costosos en energía. En este contexto, la aparición de mecanismos para el aprovisionamiento de ciertos elementos, como son los metales, impidiendo o limitando sus efectos nocivos (tóxicos) supuso, sin duda, un reto en la evolución de los animales acuáticos. Sin embargo, a pesar del desarrollo de mecanismos de regulación, la entrada pasiva, a partir del agua, acaba siendo inevitable y, en este punto, se hacen imprescindibles los mecanismos que permiten la eliminación de metales (Chapman *et al.*, 1996).

Teniendo en cuenta que sólo existirá acumulación de una sustancia química cuando la tasa de captación de dicha sustancia, por parte del organismo, supere la tasa de eliminación, la concentración de una sustancia determinada en el organismo dependerá de la eficacia de los procesos que participen en la captación, distribución, metabolismo (destoxificación) y excreción de la misma (Roesijadi, 1992; Rainbow, 1998).

Dado que los animales transportan y transforman activamente distintas sustancias químicas en sus tejidos, es difícil describir los factores que afectan a su captación y distribución. Una forma útil de aproximarse a la descripción real de estos procesos es el uso de modelos farmacocinéticos o toxicocinéticos, similares a

los que se usan en farmacología para describir el transcurso de drogas o fármacos administrados a animales mamíferos.

El objetivo de este capítulo consiste en el empleo de modelos farmacocinéticos para el estudio de la acumulación y eliminación de cadmio en distintas poblaciones de *Artemia*.

Las diferencias anatómicas, ecológicas, funcionales o de comportamiento de las distintas poblaciones empleadas pueden influir en el comportamiento toxicocinético del cadmio, como se ha comprobado en otros grupos de crustáceos (Rainbow, 1998), lo cual, a su vez, podrá influir en la toxicidad del metal en las diferentes poblaciones.

Los patrones de acumulación-eliminación pueden ayudar a entender mejor las posibles estrategias adquiridas por estos organismos para eludir la acción tóxica del cadmio y aportan información sobre la diversidad ecológica y fisiológica de *Artemia*.

Para que los metales puedan ser captados desde el ambiente acuático y transportados a través de membranas biológicas, es necesario su presencia o disponibilidad en forma soluble. Distintos factores ambientales pueden modificar la forma química en que se encuentra el metal, afectando la biodisponibilidad. También debemos considerar las distintas vías de entrada por las que el metal puede ser incorporado al organismo, así como las distintas rutas para su distribución en diferentes órganos y tejidos.

#### 3.1.1.- Biodisponibilidad

En el medio marino, el cadmio está presente en 3 fases: disuelto en el agua, en la materia particulada y en los sedimentos, siendo el coeficiente de distribución que relaciona el cadmio disuelto y particulado relativamente constante (Wright y Welbourn, 1994). En la materia particulada, la mayoría de cadmio está unido a partículas de excrementos e hidróxido de manganeso y, en ambos casos, la adsorción de cadmio depende en gran medida de la dureza o salinidad y el pH del medio. El cadmio, a diferencia de otros metales, es desplazado de la materia particulada, a la que está unido, por los iones cloro para formar compuestos cloruro (ElbayPoulichet *et al.*, 1987 citada en Brown y Depledge (1998)). En los

sedimentos, cambios fisicoquímicos del medio pueden aumentar la disponibilidad del cadmio en la materia orgánica. La forma predominante en que se encuentra el cadmio disuelto en el agua es unido al componente inorgánico, fundamentalmente en forma de cloruros. Byrne *et al.* (1988) calcularon que el 97% del total del cadmio en el agua marina debe estar en forma de complejos de cloro, predominantemente  $\text{CdCl}^-$  y  $\text{CdCl}_2^0$ , además de  $\text{CdCl}_3^-$ , que también está presente. De los estudios de reparto del cadmio entre la fase acuosa y la materia suspendida, se desprende que la fase acuosa es la más importante fuente de cadmio, con 64,9  $\mu\text{g Cd/L}$  en el agua y 1,5  $\mu\text{g Cd/L}$ , unido a la materia particulada suspendida (Jenner *et al.*, 1991). En los sistemas acuáticos, el cadmio es, principalmente, absorbido por los organismos directamente del agua en su forma Cd (II).

### 3.1.2.- Vías de entrada y distribución

Los metales pueden penetrar en los organismos acuáticos a través de aquellas superficies expuestas al medio exterior, bien directamente en forma soluble desde el agua circundante a través de la superficie externa permeable o bien a través del tracto digestivo. Algunos metales, como el cadmio, pueden ser también incorporados por transporte activo a través de bombas de calcio (Depledge y Rainbow, 1990; Rainbow, 1997).

*Artemia* es un animal hipoosmorregulador fuerte, eurihalino y de tegumento muy impermeable (Spicer, 1995). En agua marina (35 g/L de salinidad), los individuos de *Artemia* son hipoosmóticos; pierden agua a través del integumento y la recuperan bebiendo, activamente, agua del medio. En condiciones normales pueden beber un 5% de su peso al día (Navarro *et al.*, 1993).

El metal, una vez en el interior del animal, se une rápidamente a ligandos celulares en el epitelio y, después, a constituyentes de la hemolinfa (generalmente proteínas transportadoras de oxígeno), limitando, así, la difusión hacia el exterior. El transporte, desde la superficie permeable hasta los distintos órganos, tiene lugar por medio del líquido circulante (hemolinfa), donde los metales se pueden unir de manera más o menos específica a proteínas, aunque no se conocen bien los

mecanismos por los cuales los metales son transportados (Torreblanca *et al.*, 1993).

Todos los pigmentos respiratorios conocidos son metaloproteínas que unen específicamente un metal (hierro o cobre) en el centro de unión con el oxígeno y, además, suelen unir de forma inespecífica otros metales. Por otro lado, se han encontrado otras proteínas, presentes en la hemolinfa, capaces de unir metales de una forma específica (transferrina) o inespecífica (Torreblanca *et al.*, 1993). Se ha descrito la unión del cobre a la hemoglobina de *Artemia* del mismo modo que se une en la hemoglobina de vertebrados, aunque el efecto de los metales pesados en este pigmento no está suficientemente estudiado (Spicer, 1995). En crustáceos decápodos, se ha comprobado que el cadmio y el zinc se unen a la hemocianina y, en gusanos poliquetos, a la hemeritrina (Mas y Azcue, 1993).

A lo largo de las primeras porciones del tracto digestivo, el agua ingerida restará agua a los líquidos corporales por ósmosis. La captación de agua se realiza a través de un transporte activo de iones mono y divalentes desde el fluido intestinal hacia la hemolinfa, con el consiguiente paso de agua de forma pasiva. Por último, el exceso de carga salina es expulsado a través de los parápodos por transporte activo (Amat, 1985). Se puede considerar que la mayor parte de los metales, como el cadmio, ingresan en *Artemia* en forma soluble a través del epitelio digestivo (Rainbow, 1998), porque el epitelio intestinal es la principal superficie osmorreguladora en *Artemia* (Navarro *et al.*, 1993).

A pesar del evidente interés fisiológico de este tipo de estudios, en el presente trabajo se han considerado los procesos globales de acumulación y eliminación.

### 3.1.3.- Modelos farmacocinéticos

La aplicación de modelos toxicocinéticos permite la caracterización matemática de los procesos de captación, distribución y eliminación de sustancias en los animales. Dicha caracterización matemática de estos procesos permite la predicción cuantitativa de las cantidades y concentraciones de una sustancia en el organismo en función del tiempo y la concentración o la dosis (Barron *et al.*, 1990).

Entre los modelos que describen la cinética de un tóxico, destacan, por su uso y éxito de aplicación, los modelos compartimentales y los modelos fisiológicos (Landrum *et al.*, 1992). Los modelos compartimentales son los más ampliamente usados. Consisten básicamente en una descripción matemática simplificada del comportamiento de una sustancia en un animal, estando el organismo representado por un sistema de compartimentos. Un compartimento no representa, necesariamente, tejidos u órganos específicos, sino más bien aquellas estructuras que son cinéticamente indistinguibles para una sustancia considerada (Rand y Petrocelli, 1985; Barron *et al.*, 1990).

Los modelos compartimentales pueden ser descritos a través de diferentes formalismos matemáticos que tan sólo difieren en la parametrización del modelo. Básicamente, consisten en compartimentos y constantes de transferencia. La elección de un modelo en particular, a menudo, depende de la aplicación o el uso de los resultados obtenidos destacando dos tipos de modelos, denominados "de fugacidad" y de "aclaramiento". Los primeros se han aplicado, sobre todo, en modelos de previsión de riesgos medioambientales. Los modelos de aclaramiento son ampliamente utilizados en farmacocinética clínica porque tienen la ventaja de ser fisiológicamente interpretables y contienen parámetros que son directamente dependientes de la fisiología del organismo. Sin embargo, dichos modelos presentan una dificultad añadida, ya que necesitan un mayor número de parámetros y un mejor conocimiento de la fisiología del animal, por lo que, en muchas ocasiones, no se pueden emplear debido a limitaciones tan importantes como el tamaño del animal, como ocurre, por ejemplo, en el caso de *Artemia*. Por esta razón, el modelo que nosotros hemos usado es el que tradicionalmente se emplea en toxicología acuática y que se basa en constantes de aclaramiento y constantes de velocidad.

#### 3.1.4.- Modelo farmacocinético simple bicompartimental

Aunque, tradicionalmente, los modelos farmacocinéticos han usado la sangre o el plasma como tejido de referencia para medir la concentración del tóxico, por su fácil recolección y por su relación con los demás tejidos, existen relativamente pocos trabajos con animales acuáticos que midan la concentración de una sustancia

química en la sangre a lo largo del tiempo. En su lugar, miden la concentración en un tejido específico o en todo el organismo, y el sistema de referencia suele ser el medio de exposición. Esta fue, precisamente, la aproximación utilizada en los primeros intentos de solucionar el complejo problema de estimar la acumulación de un xenobiótico en animales acuáticos, usando tasas de acumulación y eliminación y considerando al animal como un único compartimento (Branson *et al.* 1975 citada en Barron *et al.* (1990). Es el modelo más simple y uno de los más frecuentemente usados en toxicología acuática (Barron *et al.*, 1990; Rand, 1995). Esta simplificación, junto con las especificaciones que hemos citado anteriormente, perfilan básicamente las características de nuestro diseño experimental: se trata de un modelo bicompartimental basado en coeficientes de velocidad que toman la forma de tasa de aclaramiento y constante de velocidad, en el cual se representa a los individuos de *Artemia* como un sólo compartimento. El agua representa el compartimento fuente, y *Artemia* es el sumidero de la sustancia. En nuestro caso, el modelo relaciona la cantidad o concentración de cadmio entre ambos compartimentos.

El modelo compartimental obliga a asumir la existencia de una distribución instantánea y una distribución lineal de la sustancia considerada. La distribución instantánea significa que una sustancia, una vez dentro del organismo, se distribuye instantáneamente a lo largo del compartimento. La distribución lineal supone que la concentración de la sustancia en cada tejido asociado con el compartimento es directamente proporcional a la cantidad de sustancia en dicho compartimento (Barron *et al.*, 1990).

Nuestro diseño experimental consiste en una primera fase de exposición, durante la cual, los individuos permanecen expuestos al metal y se produce la acumulación del mismo. Dicha fase se prolonga, en la mayoría de los casos, hasta que se alcanza un estado de equilibrio dinámico. Tradicionalmente, el modo más directo de cuantificar la bioacumulación ha consistido en exponer a los organismos a una concentración constante de un tóxico en el agua hasta que la concentración en el organismo (o tejido) permanece constante, es decir, alcanza el mencionado estado de equilibrio (Spacie y Hamelik, 1985 citado de Barron *et al.*, (1990)). A

continuación, le sigue una segunda fase de eliminación cuando los individuos son trasladados a un medio carente de tóxico, donde permanecen hasta la eliminación total del metal previamente acumulado. Posteriormente, se calculan las tasas de acumulación y eliminación que definen la cinética del tóxico en el organismo.

El modelo queda descrito por la siguiente expresión (Landrum *et al.*, 1992; Rand, 1995):

$$dCa/dt=(Ka \cdot Cw)-(Ke \cdot Ca)$$

Donde  $Ka$  es una tasa de aclaramiento ( $\text{mL}/(\text{g} \cdot \text{h})$ ) condicional, que describe la incorporación del metal como un flujo de entrada en el organismo.  $Ke$  es una constante de velocidad condicional de eliminación ( $\text{h}^{-1}$ ) (Landrum *et al.*, 1992). Ambas constantes son "condicionales" porque dependen de las condiciones experimentales.  $Ca$  representa la concentración de metal en el animal,  $t$  la unidad de tiempo y  $Cw$  la concentración de metal en el agua. Se puede calcular el valor de la tasa de entrada de metal ("influx"),  $I$  ( $\mu\text{g Cd}/\text{g} \cdot \text{h}$ ), como el producto de  $Ka$  por  $Cw$  (Wang, 2001).

A menudo se ha utilizado  $Kd$  para designar la constante de velocidad de eliminación. Sin embargo, éste debe ser reservado para el caso en que se obtenga esta tasa de eliminación, exclusivamente, en ausencia del tóxico (Landrum *et al.*, 1992).

Conforme el tiempo se aproxima al infinito, la concentración de la sustancia en el organismo se aproxima a una constante de equilibrio (dinámico). En condiciones de equilibrio se cumple que:

$$dCa/dt=0=(Ka \cdot Cw)-(Ke \cdot Ca)$$

$$Ka/Ke=Cae/Cw$$

Donde  $Cae$  se define como la concentración del tóxico en el animal en el estado de equilibrio. En este punto, se puede calcular el denominado  $BCF$ , factor de

bioconcentración, que se ha calculado como el cociente entre la concentración de metal en los tejidos (peso húmedo) y la concentración del metal en el agua, ambas en el estado de equilibrio:

$$\mathbf{BCF=Ka/Ke=Cae/Cw}$$

Como vemos, el *BCF* se puede estimar a partir de los datos experimentales y, también conocida la cinética del tóxico en el animal, puede ser predicho a través de *Ka/Ke*. La estimación de *BCFs* utilizando modelos compartimentales ha sido ampliamente utilizado en toxicología ambiental (Barron *et al.*, 1990).

El modelo, además de los supuestos de instantaneidad y linealidad, asume como válidos otros supuestos. En primer lugar, considera a cada animal de experimentación como un único compartimento. Además, asume que la asimilación del cadmio, objeto de estudio, se produce, principalmente, por vía acuosa, y que la concentración de metal en el animal es proporcional a la concentración de metal en el agua. El contenido de cadmio en todos los animales de experimentación pertenece a un acervo común, y la tasa de eliminación, independientemente del mecanismo, es directamente proporcional a la concentración en el organismo (Rand, 1995). Considera también que el volumen del compartimento es constante, es decir, no se produce crecimiento significativo de los animales de experimentación (Landrum *et al.*, 1992).

Las constantes de velocidad, *Ka* y *Ke* pueden ser determinados por un sencillo balance de masas tras la exposición de los individuos al metal. Si la concentración de la sustancia en el agua es constante, la primera ecuación puede ser integrada (Landrum *et al.*, 1992) para dar:

$$\mathbf{Ca=(Ka\cdot Cw/Ke)\cdot(1-e^{(-Ke\cdot t)})}$$

A partir de esta ecuación podemos estimar el tiempo necesario para alcanzar el estado de equilibrio y también la persistencia de la sustancia, medida como la "vida

media" ( $t_{1/2}$ ), determinada a partir de la tasa de eliminación. El tiempo de vida media se define como el tiempo requerido para que un organismo, mantenido en agua limpia, elimine de sus tejidos el 50% del contaminante. El tiempo de vida media se calcula como:

$$K_e = -\ln 0,5 / t_{50} = 0,693 / t_{50}$$

$$t_{50} = 0,693 / K_e$$

El tiempo para alcanzar el estado de equilibrio también es dependiente de la constante de eliminación, y del mismo modo que la vida media, el tiempo para alcanzar el 95 % del estado de equilibrio se calcula como:

$$C = 0,05 \cdot C_{ae}$$

$$t_{95} = \ln 0,05 / K_e$$

A pesar de las limitaciones, los modelos compartimentales, permiten la descripción de la cinética de los xenobióticos en organismos acuáticos y proporcionan un método rápido para estimar los BCFs con un mínimo de datos experimentales, así como predicen, cuantitativamente, las cantidades y concentraciones de una sustancia en el organismo en función del tiempo y la concentración empleados en la exposición.

En el presente trabajo, pretendemos, en primer lugar, aplicar un modelo bicompartimental (agua-organismo) con cinética de primer orden que nos permita explicar y predecir los niveles de cadmio presentes en *Artemia* y el mecanismo de acumulación-eliminación.

En segundo lugar, estudiar la influencia de la concentración de cadmio a la que son expuestos los animales sobre los parámetros cinéticos que definen el modelo.

Por último, estudiaremos las diferencias existentes en el mecanismo de acumulación de cadmio en diferentes poblaciones de *Artemia*.

## 3.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

Gran parte de las experiencias requeridas para el estudio de la cinética de acumulación y eliminación de cadmio en *Artemia* se realizaron en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (Castellón), dada la imposibilidad de obtener grandes masas de individuos adultos en nuestras instalaciones. Las poblaciones seleccionadas coinciden con las utilizadas en el estudio de toxicidad aguda en nauplios (capítulo anterior), excepto las correspondientes a las cepas Megrine y Delta del Ebro.

### 3.2.1.- Eclosión, crecimiento y aclimatación del cultivo.

Los individuos se obtuvieron tras la eclosión de quistes recolectados directamente en el hábitat natural y mantenidos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su conservación hasta el momento de su utilización. Para ello, se procedió a la hidratación y posterior incubación en agua marina (salinidad 38 g/L) a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con aireación e iluminación constantes durante 48 horas. Una vez eclosionados, los nauplios se trasvasaron a recipientes con una salinidad de 60 g/L durante 24 horas, para que se aclimataran a las condiciones del cultivo de crecimiento. Los individuos crecieron en un medio con salinidad de 60-65 g/L, mantenidos a temperatura ambiente y fotoperiodo variable con las estaciones, alimentadas *ad libitum* con una mezcla de alga *Dunaliella* sp y *Tetraselmis* sp. Previamente a alcanzar la madurez sexual, los individuos fueron separados y aclimatados durante 3 días a las diferentes condiciones del estudio de la fase de acumulación (apartado 3.2.3).

### 3.2.2.- Cultivo de algas

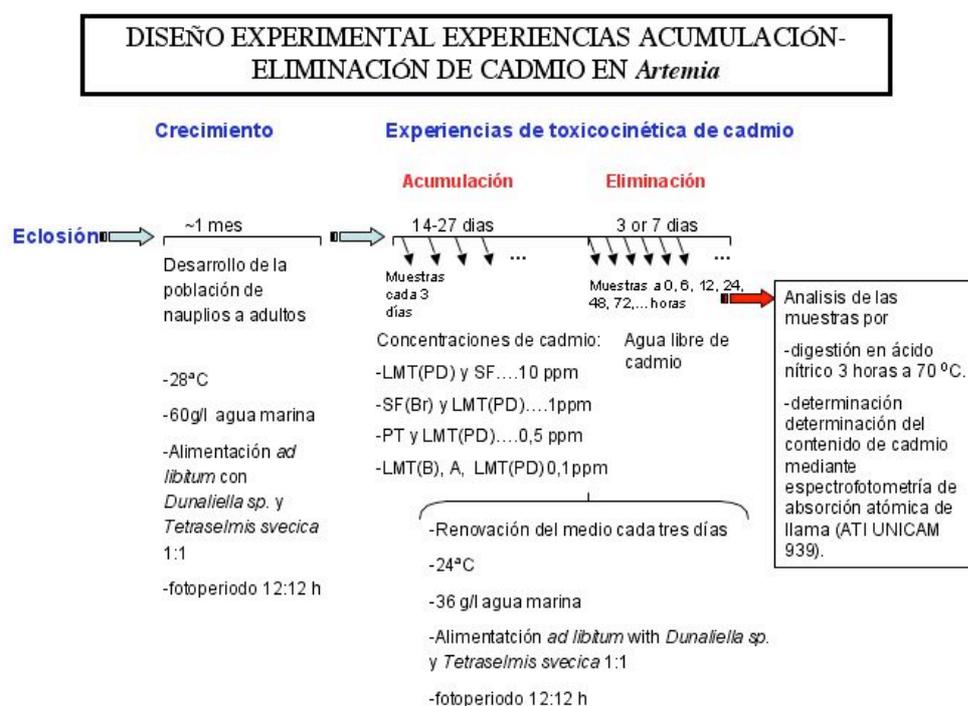
Para la alimentación de *Artemia*, se utilizaron las algas unicelulares *Dunaliella* y *Tetraselmis*, que se cultivan de manera permanente en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC). *Dunaliella* es un alga clorofícea y *Tetraselmis* es un alga prasinofícea flagelada, de forma elipsoidal y de pequeño tamaño (13  $\mu\text{m}$ ), ambas son consideradas un alimento adecuado para *Artemia* (Amat, 1985).

Las poblaciones se mantuvieron en grandes bolsas de plástico de 20 L con agua marina en las mismas condiciones que las poblaciones de *Artemia*. Una vez obtenida una densidad importante de población, se sembraron semanalmente

otros recipientes, con el fin de ampliar y mantener la colonia, a los que se añadió medio nuevo y los nutrientes y oligoelementos para su adecuado desarrollo. Con este fin se utilizó el abono foliar NUTRILEAF (Agrodan S.A.).

### 3.2.3.- Aplicación de un modelo toxicocinético de acumulación y eliminación de cadmio en Artemia.

Tal como se ha descrito en el apartado 3.1.4, el modelo toxicocinético elegido para describir la acumulación y eliminación de cadmio en *Artemia*, requirió la determinación del contenido de metal en los animales a lo largo del tiempo de exposición. Para ello se siguió un diseño experimental que aparece representado en la figura 3.1.



**Figura 3.1.** Diseño experimental de las experiencias de acumulación-eliminación en *Artemia*.

Tras la aclimatación a las condiciones de salinidad, temperatura y alimentación, se tomaron 400 individuos y se repartieron en 4 recipientes. Tres de estos

recipientes contenían una concentración conocida de cadmio y el cuarto sirvió de control. Cada tres días se tomaba una muestra, de 10 individuos de cada uno de los recipientes, así como 10 mL del medio de cultivo para su posterior análisis.

Transcurridas 336-648 horas, los animales supervivientes se trasladaron a otros cuatro recipientes que contenían medio de cultivo libre de cadmio para iniciar la fase de eliminación. Se tomaron muestras de animales y de medio de cultivo a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas. En las experiencias con *A. salina* y las poblaciones de LMT (PD) expuestas a 1, 0,5 y 0,1 mg/L, la fase de eliminación se prolongó hasta los 168 horas (7 días).

Las condiciones en que se realizaron las experiencias fueron: salinidad del medio de 38 g/L, temperatura constante de 23 °C en cámara atemperada (climatizada), alimentación *ad libitum* con el alga unicelular *Tetraselmis*, aireación ligera y constante e iluminación con luz fluorescente con fotoperiodo de 12 h luz: 12 h oscuridad.

En aquellos recipientes que contenían cadmio, dicho metal fue añadido al agua marina al principio de la experiencia y cada vez que se renovó el medio (condiciones semiestáticas). Las concentraciones de cadmio elegidas fueron de 0,1, 0,5, 1 ó 10 mg Cd/L, dependiendo de la sensibilidad de cada especie/cepa elegida. Por ello, fue necesario realizar experiencias previas empleando series de concentraciones decrecientes, hasta seleccionar la concentración adecuada que provocaba una mortalidad tal que permitía la supervivencia de suficiente número de individuos, para no comprometer la finalización de las experiencias de eliminación. La población de LMT(PD) se eligió como población de referencia y, por ello, se realizaron experiencias con la exposición a todas las concentraciones antes mencionadas.

Realizadas las experiencias y, tras la recolección, todas las muestras de *Artemia* fueron enjuagadas con agua destilada, pesadas y congeladas a -20 °C.

#### 3.2.4.- Determinación del contenido de cadmio.

Para la determinación del contenido de cadmio, las muestras de *Artemia* fueron digeridas en ácido nítrico a 70 °C durante tres horas, diluidas con agua ultrapura y,

por último, analizadas mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA), utilizando un espectrofotómetro ATI UNICAM 939. Las muestras de agua fueron convenientemente diluidas y se les añadió ácido nítrico hasta alcanzar una concentración final del 5%.

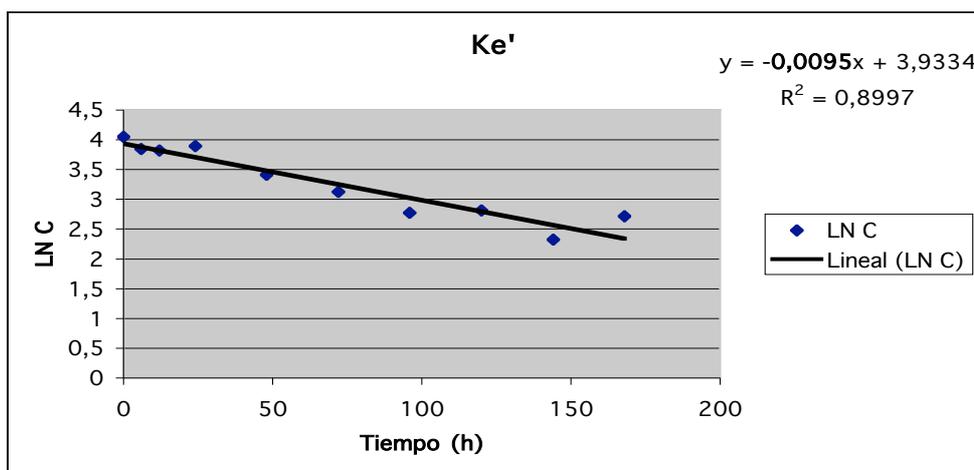
### 3.2.5.- Procesado de los datos y estudio cinético

El modelo matemático aplicado es el más sencillo que se conoce, considerándose al organismo como un solo compartimento y la cinética de eliminación de primer orden (Landrum *et al.*, 1992; Rand, 1995).

La estima de los parámetros cinéticos se puede realizar a partir de las porciones lineales de ambas fases, o bien, a través de ajustes a curvas no lineales si la exposición es lo suficientemente larga como para aproximarse a un estado de equilibrio (Landrum *et al.*, 1992). Para realizar la predicción en los modelos de regresión no lineal se pueden utilizar los métodos OLS (mínimos cuadrados) o métodos ML (de máxima similitud). Las estimas de los parámetros basados en OLS son aquellas que minimizan la diferencia de la suma de cuadrados entre los valores observados y los ajustados, y se determinan mediante la resolución de un conjunto de ecuaciones simultáneas normales. La resolución de estas ecuaciones es más compleja que en los modelos lineales, por lo que se requiere algún tipo de búsqueda iterativa en que se prueban diferentes estimas de forma secuencial (Barron *et al.*, 1990). Obviamente, con dos parámetros, el número de posibles combinaciones de valores para los parámetros es prácticamente infinito. El método más común es el algoritmo de Gauss-Newton o alguna modificación de éste (Myers, 1990 citado de Quinn y Keough (2002)). El programa estadístico que elegimos para el presente estudio utiliza el algoritmo de Levenberg-Marquardt como método iterativo. Estos programas requieren estimas iniciales que sean lo más realistas posibles. Cuanto más complejo es el modelo más importante es que los valores de partida estén razonablemente cerca de los valores reales de los parámetros. Las mejores estimas se consiguen cuando las iteraciones secuenciales convergen (Quinn y Keough, 2002).

Los valores iniciales de los parámetros cinéticos, en nuestras experiencias, se calcularon a partir de los valores medios de contenido en cadmio de las muestras

de *Artemia* para cada tiempo de exposición, siguiendo el método gráfico de Rand y Petrocelli (1995). En la figura 3.2 y tabla 3.1, se presenta a modo de ejemplo, el procedimiento seguido en LMT(PD) expuesta a 0,5 mg/L de cadmio para la obtención de los valores iniciales de tasa de acumulación  $K_a'$  y  $K_e'$ . Los valores iniciales de la constante de eliminación,  $K_e'$  fueron estimados por regresión lineal (en escala logarítmica) de los niveles de metal de la fase de eliminación. Una vez calculada la  $K_e'$ , los valores iniciales de tasa de acumulación  $K_a'$  se calcularon mediante el ajuste de regresión de la fase inicial lineal de acumulación, como la media de los valores de  $(\text{tangente} + (K_e' \cdot C)/C_w)$  en cada tiempo de acumulación.



**Figura 3.2.** Relación entre el logaritmo neperiano de la concentración de cadmio en las muestras ( $\mu\text{g Cd/gr}$ ) y el tiempo que permanecieron en agua libre de metal. Las muestras corresponden a individuos de LMT(PD) previamente expuestos a 0,5 mg/L de cadmio en el agua.

Utilizando los valores iniciales de los parámetros cinéticos así obtenidos, aplicamos a nuestros datos experimentales una regresión no-lineal con la ayuda del paquete estadístico SPSS (SPSS Inc.). Este programa genera unos valores para las constantes de velocidad  $K_a$  y  $K_e$  y un intervalo de confianza para cada uno de ellos y nos permite realizar una predicción de los valores medios de  $\mu\text{g Cd/g}$  en las muestras para cada tiempo. El programa utilizado proporciona también el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para cada uno de los ajustes.

**Tabla 3.1.** Cálculo de la estima inicial de  $K_a'$  en la población de LMT(PD) expuesta a 0,5 mg/L de cadmio. T exp= tiempos de exposición; C= la concentración media de cadmio en *Artemia* en cada tiempo de la fase de acumulación; Cw= la concentración media de cadmio en el agua en cada tiempo; y la tangente= C/T exp.

T exp	Tangente	$K_e'$	C	Cw	$K_a'$
0		0,0095	0	0	
72	0,14132	0,0095	10,175	0,411	0,57903
168	0,11342	0,0095	19,055	0,351	0,83887
240	0,06920	0,0095	16,607	0,427	0,53153
312	0,12558	0,0095	39,181	0,469	1,06141
384	0,14965	0,0095	57,466	0,390	1,78353
<b>Promedios</b>				0,4096	<b>0,9589</b>
LN = 0,095t + 3,9334					
Kd = -0,0095					
t 1/2 = 72,96 h					
BCF (Taylor) = 117,9					
$K_a' = 0,9589$					

Para analizar las diferencias entre las poblaciones expuestas a una misma concentración, en cuanto a su modelo de acumulación-eliminación, procedimos de una forma jerarquizada, incluyendo primero un modelo general que consideraba cada pareja de poblaciones como una sola, y añadiendo, a continuación, el factor POBLACIÓN. Finalmente, se contrastó mediante el test de F de Snedecor la diferencia de la suma de cuadrados residuales entre ambos modelos. También se compararon los BCFs generados por el modelo de regresión no lineal (Bailer *et al.*, 2000) de aquellas poblaciones expuestas a una misma concentración de metal.

### 3.3.- RESULTADOS

Tal como se puede observar en la tabla 3.2, las concentraciones de cadmio en el medio no variaron apreciablemente a lo largo de las experiencias de acumulación, siendo las concentraciones reales entre un 6 y un 30 % inferiores a las nominales. También se mantuvieron relativamente constantes los valores de salinidad ( $36,4 \pm 2,2$  g/L) y pH ( $7,57 \pm 0,39$ ).

**Tabla 3.2.** Concentraciones medias de cadmio (mg/L) medidas en el agua durante la fase de acumulación durante las experiencias de acumulación.

Concentración nominal (mg/L)	Concentración real (mg/L)
0,1	$0,0806 \pm 0,0186$
0,5	$0,4481 \pm 0,0676$
1,0	$0,8355 \pm 0,0877$
10,0	$9,9503 \pm 1,3115$

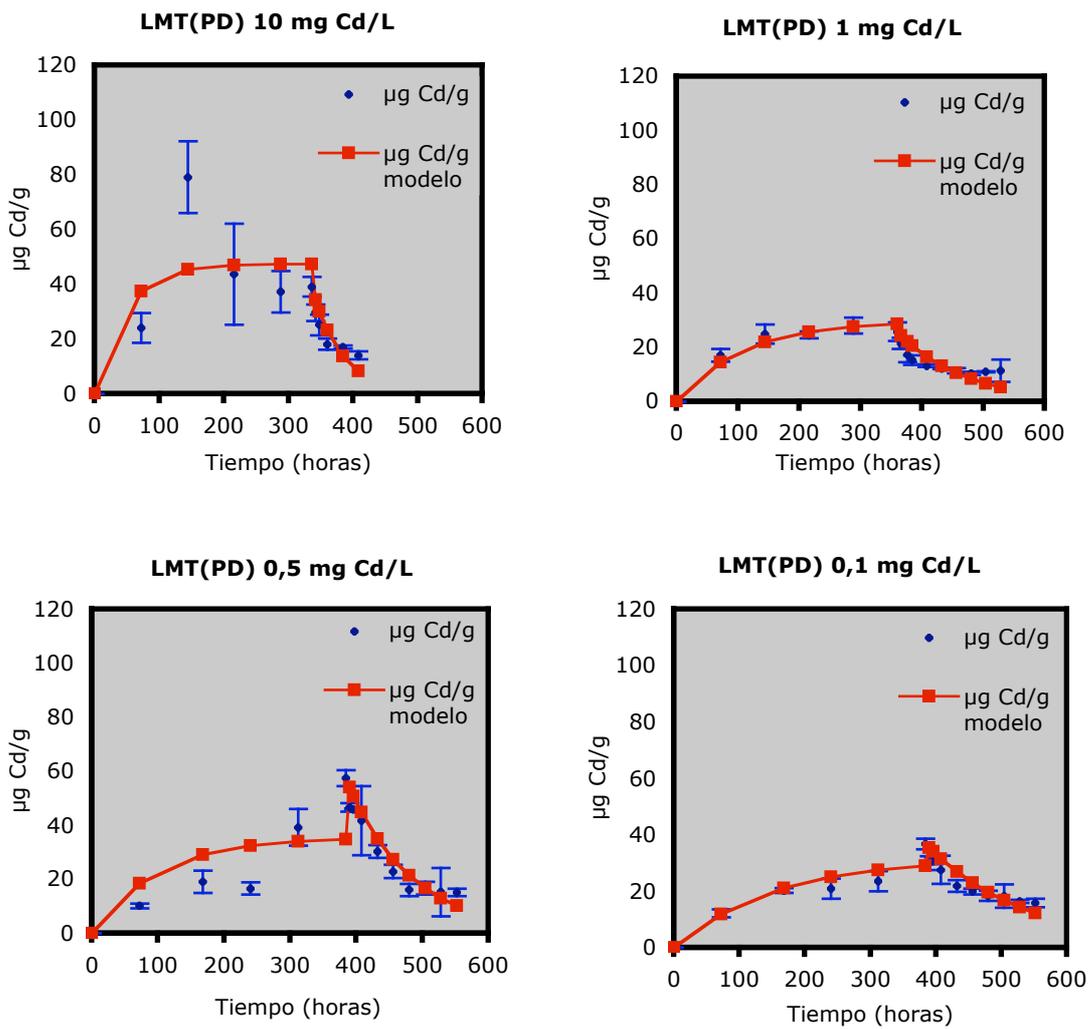
Con el fin de conocer la aplicabilidad del modelo a lo largo de un amplio rango de concentraciones de exposición, elegimos la población de LMT(PD) como población de referencia. Ésta población se escogió en función de su disponibilidad y facilidad de cultivo.

En la figura 3.3 aparecen representadas los valores de los contenidos de cadmio determinados en LMT(PD) durante las fases de exposición y posterior eliminación del mismo en el agua exenta de cadmio, así como la curva definida por los valores predichos por el modelo. En las curvas correspondientes a todas las concentraciones ensayadas, se observa una fase inicial de captación en que la concentración de cadmio en las muestras aumenta linealmente con el tiempo de exposición, seguida de un estado de equilibrio en el que no existe aumento neto de cadmio. El modelo también predice la disminución del contenido de cadmio en las muestras durante la fase de eliminación. La existencia de un pico máximo de concentración de metal alcanzada en algunas de las curvas al final de la fase de

acumulación, compromete un mejor ajuste de los valores experimentales a los predichos por el modelo.

A todas las concentraciones de exposición se aprecia una tendencia a alcanzar un estado de equilibrio dinámico como consecuencia de la compensación entre las tasas de acumulación y eliminación. Éste se alcanza completamente en el tiempo que mantuvimos la exposición a 10 mg/L de cadmio y, en el resto de experimentos, se hizo más o menos patente dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición. En cuanto a la eliminación, el modelo bicompartimental presenta un buen ajuste cuando la población es expuesta a las concentraciones más bajas (0,05 y 0,1 mg Cd/L). No lo es tanto cuando son expuestas a mayores concentraciones (10 y 1 mg/L Cd), en las que se aprecia una tendencia hacia un modelo de eliminación en dos fases; una inicial más rápida seguida de otra más lenta, más compatible con un modelo multicompartimental. También es interesante que, con independencia de la concentración de cadmio en el agua durante la fase de exposición, las concentraciones de cadmio calculadas en las muestras en el equilibrio son semejantes. Además, independientemente de la concentración alcanzada en las muestras durante la exposición, el cadmio final remanente, determinado en las muestras al final de la fase de eliminación, siempre está entre 10 y 15  $\mu\text{g Cd/g}$ .

Los parámetros cinéticos calculados a partir de los datos experimentales y que definen el modelo aparecen resumidos en la tabla 3.3.



**Figura 3.3.** Niveles de cadmio determinados en las muestras de las poblaciones de LMT(PD) expuesta a 10 mg/L (A), 1 mg/L (B), 0,5 mg/L (C) y 0,1 mg/L (D). Cada punto representa el valor medio  $\pm$  DE de la concentración de cadmio ( $\mu\text{g Cd/g}$  muestra en peso húmedo) a lo largo del tiempo en horas.  $n= 3$  . Cada muestra contenía 10 individuos.

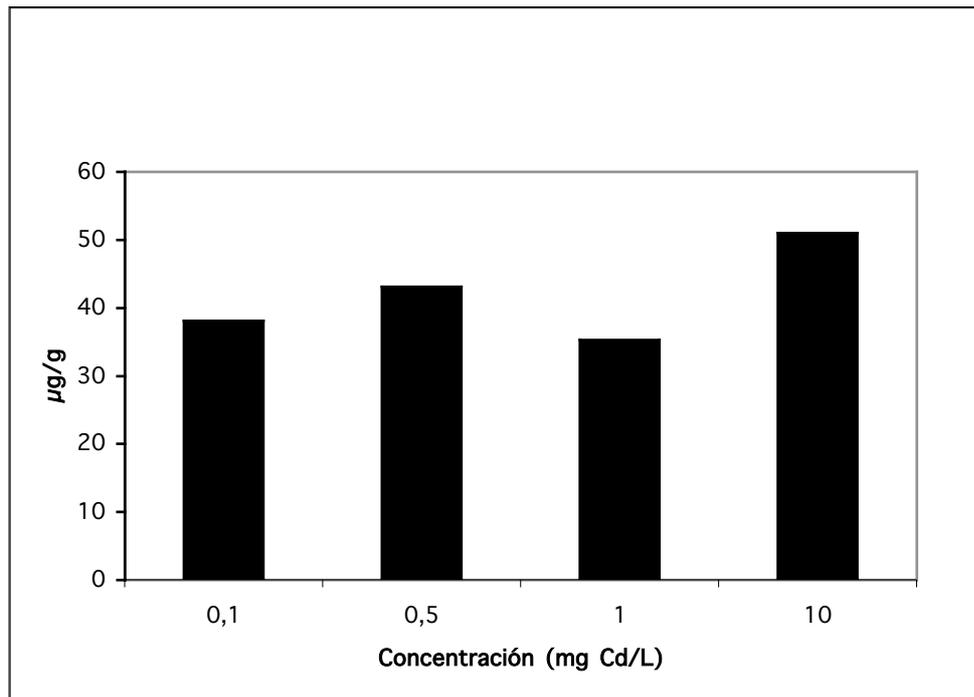
**Tabla 3.3.** Parámetros cinéticos generados por el ajuste de los datos experimentales a un modelo bicompartimental en LMTPD. Entre paréntesis se indican los límites de confianza de las constantes de velocidad y los factores de bioconcentración.

Concentración (mg Cd/L)	$K_a$ (mL/g.h)	$K_e$ (h <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (h)	$R^2$	$C_{ae}$ (μg/g)	$t_{95}$ (h) (equilibrio)	I (μg/gh)	BCF (mL/g)	BCF (mL/g) Experimental
10	0,1098 (-0,0019 – 0,2214)	0,0216 (-0,0017 – 0,0449)	32	0,62	51,0	139	1,098	5,1 (3,7-6,4)	4
1,0	0,3372 (0,2206 - 0,4538)	0,0093 (0,0064 – 0,0122)	74,5	0,81	35,3	322	0,3372	35,3 (34,2 – 36,5)	30,7
0,5	0,8909 (0,5058 – 1,2760)	0,0103 (0,0062 – 0,0144)	67,3	0,69	33,65	291	0,4455	86,1 (84,8 – 87,5)	117,9
0,1	2,4771 (1,8890 – 3,0652)	0,0065 (0,0047 – 0,0083)	106,6	0,81	38,1	461	0,2477	381,1 (379,9-382,3)	361,7

Las tasas de aclaramiento  $K_a'$  variaron desde 0,1098 (mL/(g·h)), correspondiente a una exposición de 10 mg/L, a 2,4771 (mL/(g·h)) del grupo experimental expuesto a 0,1 mg/L. Algo parecido ocurre en el caso de la tasa de entrada de metal (I), que tiene valores muy similares en el rango de exposición de 0,1 a 1mg/L de cadmio en el agua (entre 0,45 y 0,25  $\mu\text{g}/\text{gh}$ ) y alcanza valores mucho mayores (1,098  $\mu\text{g}/\text{gh}$ ) durante la exposición a 10 mg/L de cadmio en el medio. Los valores de constante de eliminación representan una pérdida que va desde el 2% del cadmio acumulado en cada hora, para los individuos expuestos a 10 mg/L, a un 0,7% de eliminación en los individuos de LMT(PD) expuestos a 0,1 mg/L de cadmio en el medio. Estas tasas de eliminación conducen a unos tiempos de vida media de entre 30 a 107 horas (tabla 3.3).

Los niveles de cadmio que el modelo predice para la fase de equilibrio en LMT(PD) (figura 3.4) son bastante semejantes para el rango de concentraciones entre 0,1 y 1 mg/L (entre 35,3 y 43,1  $\mu\text{g}/\text{g}$ ), mientras que en la exposición a 10 mg Cd/L el valor es algo mayor (51  $\mu\text{g}/\text{g}$ ).

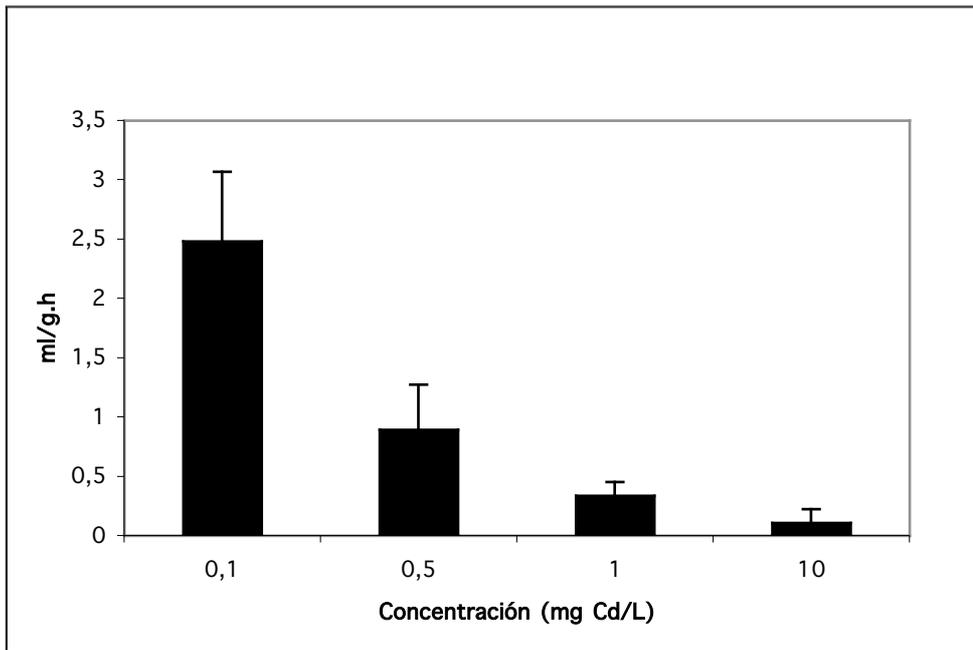
La bondad de ajuste se puede comprobar a partir de los coeficientes de determinación  $R^2$ , que fueron iguales o superiores a 0,62 en todas las curvas, y también puede ser inferido a través de la coincidencia del BCF estimado a partir de los parámetros del modelo y el calculado a partir de los datos experimentales. Aunque este último, en algunas ocasiones, cae fuera de los límites de confianza del modelo, los valores son similares y siempre dentro del mismo orden de magnitud.



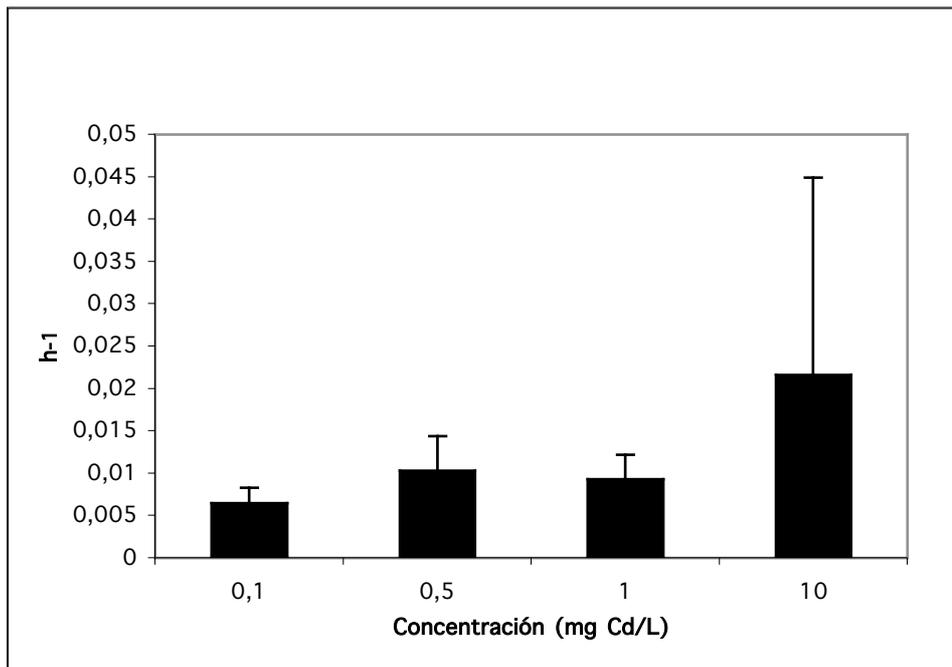
**Figura 3.4.** Valores de la concentración de cadmio ( $\mu\text{g/g}$ ) en individuos de LMT(PD), estimados a partir del modelo para el estado de equilibrio, en función de la concentración de cadmio en el agua.

El tiempo para alcanzar el equilibrio estimado por el modelo está en relación inversa con la concentración de exposición. Así, encontramos valores que van desde las 139 h en la exposición a 10 mg Cd/L a 461 h para 0,1 mg /L de cadmio en el agua.

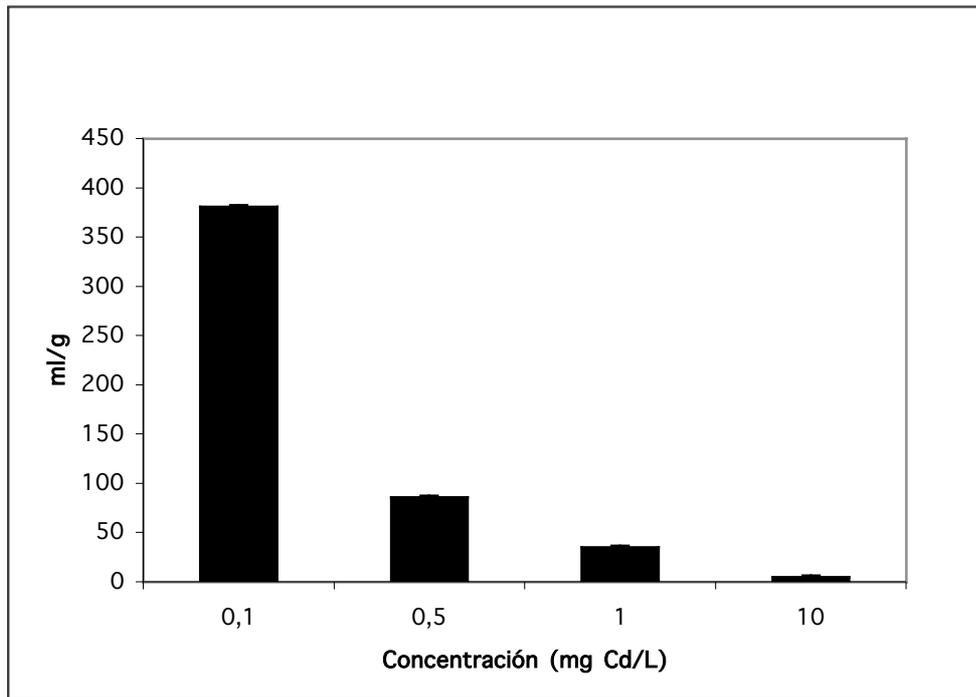
En las figuras 3.5, 3.6 y 3.7 están representadas las relaciones entre los parámetros cinéticos  $K_a$ ,  $K_e$  y BCF con la concentración de exposición. Los valores de BCFs siguen una relación inversa con la concentración, al igual que la tasa de acumulación, mientras que la constante de eliminación parece que tiene una relación directa con la concentración de exposición. Sin embargo, los valores correspondientes a la tasa de entrada de metal se mantienen relativamente constantes en el rango de concentraciones comprendido entre 0,1 y 1 mg Cd/L, y son algo mayores a 10 mg Cd/L de exposición (figura 3.8).



**Figura 3.5.** Tasas de acumulación obtenidas por el modelo cinético en LMT(PD) en función de la concentración de cadmio en el agua.

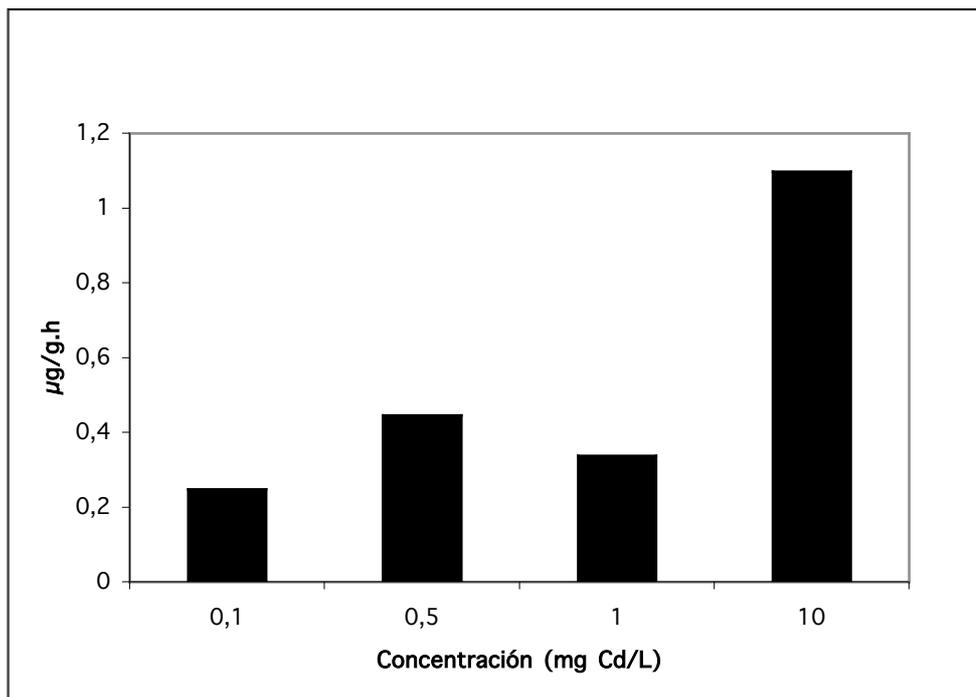


**Figura 3.6.** Tasas de eliminación obtenidas por el modelo cinético en LMT(PD) en función de la concentración de cadmio en el agua.



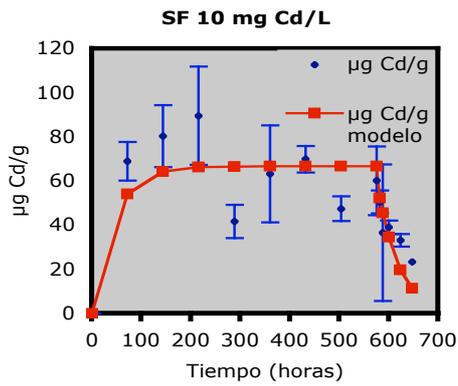
**Figura 3.7.** Factores de concentración obtenidos por el modelo cinético en LMT(PD) en función de la concentración de exposición de cadmio en el agua.

A pesar del buen ajuste del modelo a nuestros datos y las posibilidades que nos ofrecen los parámetros cinéticos para comparar el patrón de acumulación de cadmio, la alta dependencia encontrada entre las constantes del modelo y BCF con la concentración de metal presente en el agua nos limitará la comparación de los modelos a aquellas poblaciones expuestas a la misma concentración de cadmio.

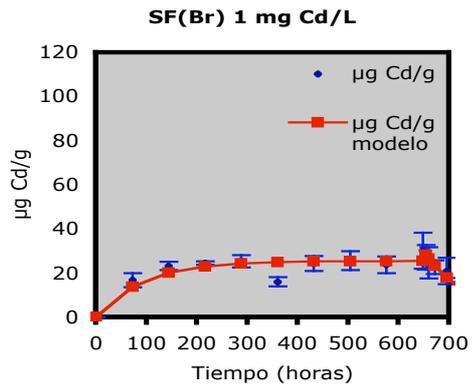


**Figura 3.8.** Tasas de entrada de metal calculadas a partir del modelo cinético en LMT(PD), en función de la concentración de exposición de cadmio en el agua.

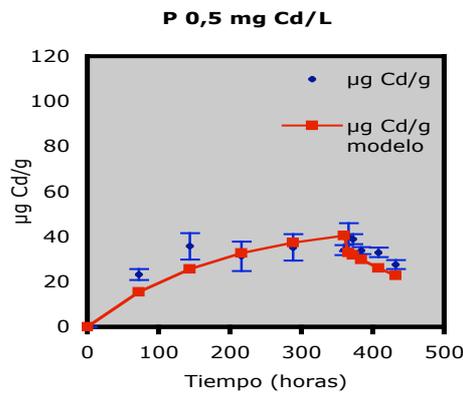
En la figura 3.9 se muestran los niveles de cadmio de *Artemia*, en las diferentes fases del experimento, y las curvas de regresión para el resto de poblaciones estudiadas: SF, SF(Br), P, LMT(B) y A. A partir de ellas, se observan las mismas fases de asimilación inicial lineal, directamente proporcional a la concentración en el medio, un estado de equilibrio y una fase de eliminación en todas las poblaciones. En todas las concentraciones de exposición se aprecia la tendencia a un estado de equilibrio, que se alcanza completamente y se mantiene en el tiempo en las poblaciones expuestas a 10 y 1 mg Cd/L, SF y SF(Br) En el resto, es menos aparente, dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición. En cuanto a la eliminación, todas las poblaciones eliminaron al ser transferidos a agua limpia, alcanzando niveles de entre el 23% y 64% de cadmio eliminado tras tres días en agua exenta de metal.



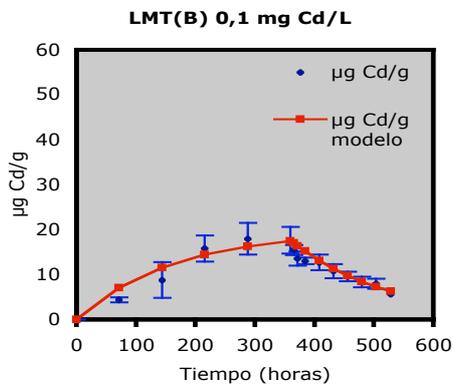
A



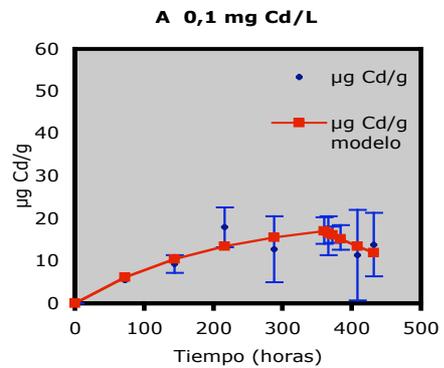
B



C



D



E

**Figura 3.9.** Concentración de cadmio determinada en las distintas poblaciones de *Artemia*: (A) Individuos de SF expuestos a 10 mg/L de cadmio, (B) SF(Br) expuestos a 1 mg/L, (C) P expuestos a 0,5 mg/L, (D) LMT(B) y (E) A expuestos a 0,1 mg/L. Cada punto representa el valor medio  $\pm$  DE de concentración de cadmio ( $\mu\text{g Cd/g}$  muestra en peso húmedo) a lo largo del tiempo en horas. N= 3-6. Cada muestra contenía 10 individuos.

En cuanto a la relación entre los parámetros cinéticos y la concentración de cadmio en el agua (tabla 3.4), podemos encontrar las mismas relaciones que observamos en LMT(PD).

Las tasas de acumulación variaron desde 0,1492 (mL/(g.h)) correspondiente a la población SF expuesta a 10 mg/L y 1,8495 (mL/(g.h)) de la población LMT(B) expuesta a 0,1 mg/L. Las constantes de eliminación van desde el 2% de pérdida de cadmio acumulado por hora en los individuos de SF expuestos a 10 mg/L, a un 0,5% de eliminación en los individuos de A expuestos a 0,1 mg/L de cadmio en el medio, que se corresponden con tiempos de vida media de entre 30 a 139 horas.

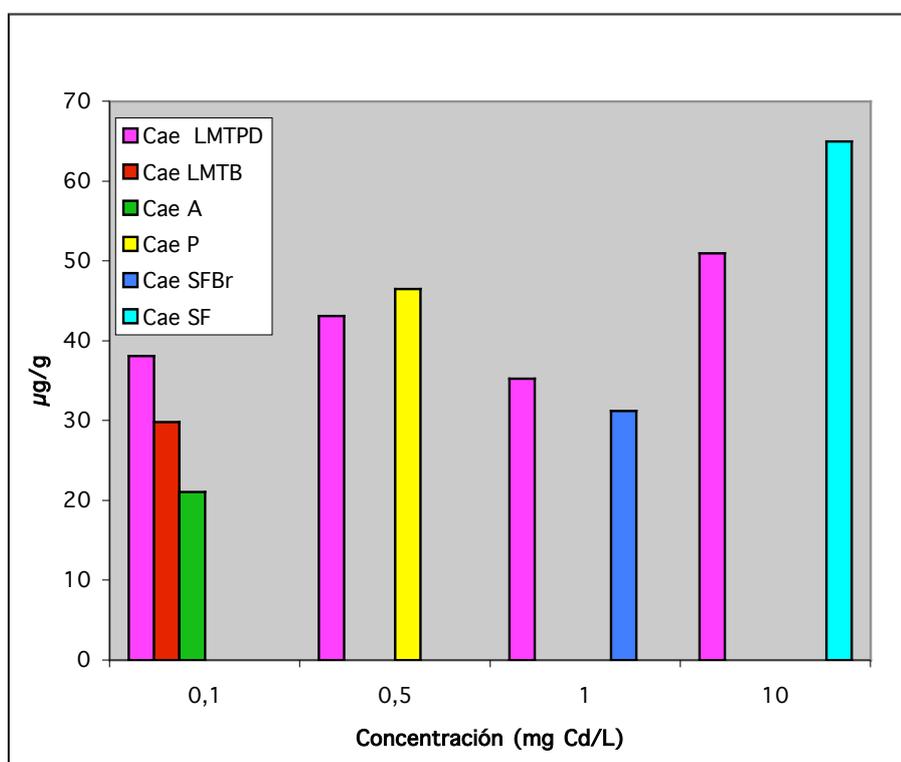
La bondad de ajuste del modelo con respecto a los datos experimentales está representada por el valor de  $R^2$  que varió entre 0,66 de SF a 0,90 de LMT(B). También encontramos un gran grado de coincidencia entre los BCFs estimados a partir de los parámetros del modelo y los calculados experimentalmente, y siempre dentro del mismo orden de magnitud.

Los niveles de cadmio en el equilibrio, estimados a partir del modelo, variaron entre 21,1  $\mu\text{g/g}$  en LMT(B) y 65  $\mu\text{g/g}$  en SF. En cuanto a la tasa de entrada de metal (I), también destacó el valor correspondiente a la población de SF, con un valor de 1,492  $\mu\text{g/gh}$ , mientras en el rango de exposición de 0,1 a 1 mg/L de cadmio en el agua, la tasa de entrada de metal varió entre 0,1056  $\mu\text{g/gh}$  de A y 0,2969  $\mu\text{g/gh}$  de SF(Br). El tiempo para alcanzar el equilibrio estimado por el modelo varió inversamente con la concentración de exposición, desde 130 h en SF durante la exposición a 10 mg Cd/L a 599 h para A expuesta a 0,1 mg /L de cadmio en el agua.

**Tabla 3.4.** Parámetros cinéticos obtenidos a partir del modelo bicompartimental aplicado a los datos de acumulación/eliminación en las poblaciones de *Artemia*. SF, SF(Br), P, LMT(B) y A. Entre paréntesis los límites de confianza de las constantes de velocidad y los factores de bioconcentración.

Población/ concentración	$K_a$ (mL/g.h)	$K_e$ (h <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (h)	$R^2$	$C_{ae}$ (μg/g)	$t_{95}$ (h) (equilibrio)	I (μg/gh)	BCF (mL/g)	BCF (mL/g) Experimental
SF 10 mg Cd/L	0,1492 (0,0424 – 0,2561)	0,0231 (0,0061 – 0,0402)	30,0	0,66	65	130	1,492	6,5 (5,3 – 7,6)	5,9
SF (Br) 1,0 mg Cd/L	0,2969 (0,1920 – 0,4007)	0,0108 (0,0067 – 0,0149)	64,2	0,79	31,2	277	0,2969	31,2 (30,1 – 32,33)	31,2
P 0,5 mg Cd/L	0,5223 (0,2057 – 0,8388)	0,0056 (-0,0001-0,0112)	123,8	0,78	46,5	535	0,2612	93 (91,4 – 94,6)	68,5
LMT(B) 0,1 mg Cd/L	1,8495 (1,5116 – 2,1873)	0,0062 (0,0047 – 0,0077)	111,8	0,90	29,8	483	0,1850	298,3 (297,2 – 299,5)	262
A 0,1 ppm	1,0564 (0,6550 – 1,4577)	0,0050 (0,0017 – 0,0084)	138,6	0,87	21,1	599	0,1056	211,3 (209,9 – 212,7)	166

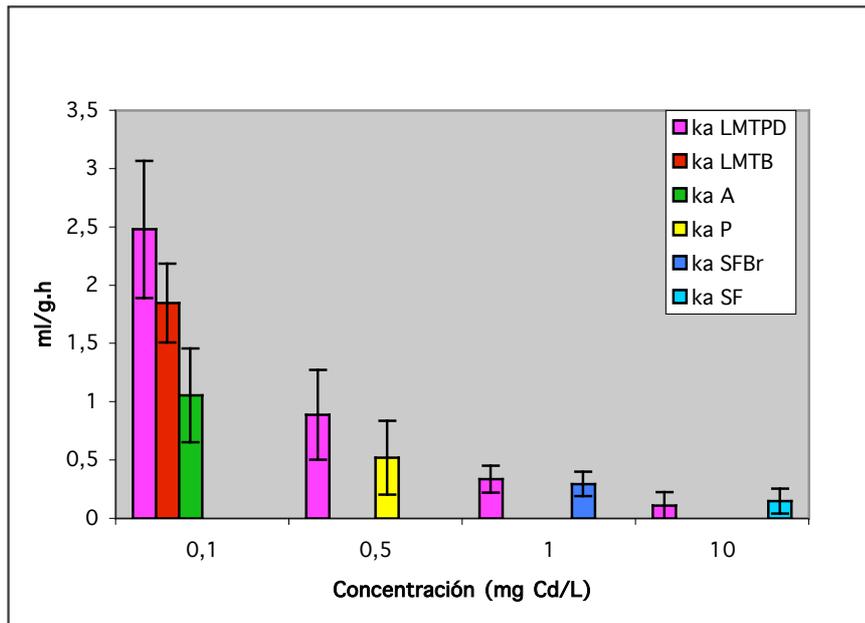
Si comparamos el comportamiento de los niveles cadmio alcanzados en el equilibrio (*Cae*) de las distintas poblaciones que han sido expuestas a una concentración similar de cadmio (figura 3.10), observamos que en las curvas de acumulación de las poblaciones de LMT(PD) y SF, expuestas a 10 mg Cd/L, los valores de cadmio en *Artemia* son similares, de 51 a 65  $\mu\text{g Cd/g}$ . Lo mismo podemos decir de *A. persimilis* y *A. salina*, que al ser al expuestas a 0,1 mg Cd/L alcanzan concentraciones de 21 y 29,8  $\mu\text{g Cd/g}$  respectivamente, siendo estos valores algo menores que los alcanzados por LMT(PD) al ser expuesta a la misma concentración (38,1  $\mu\text{g Cd/g}$ ). Las otras dos parejas de poblaciones expuestas a una misma concentración, LMT(PD) y SF(Br), por una parte, y las dos poblaciones de *Artemia parthenogenetica* (LMT(PD) y P), por otra, también alcanzaron valores similares en el equilibrio al ser expuestas a una misma concentración del metal.



**Figura 3.10.** Concentración de cadmio alcanzada en el equilibrio (*Cae*) obtenida a partir del modelo cinético en las poblaciones de *Artemia* estudiadas, en función de la concentración de cadmio en el agua.

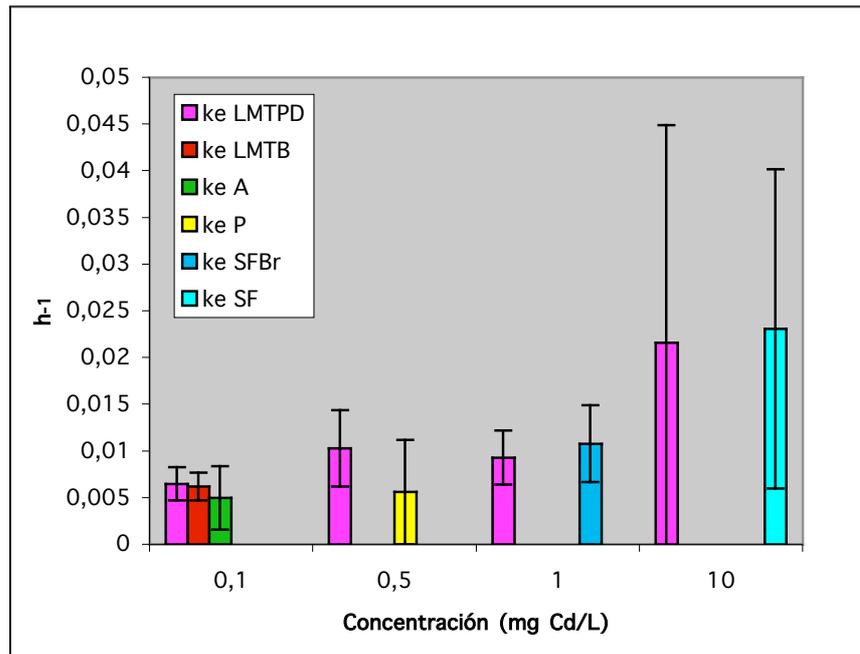
En cuanto a la eliminación, el porcentaje de cadmio eliminado al cabo de tres días de exposición en agua limpia fue, para SF y LMT(PD), de un 61 y 64% respectivamente, respecto a la concentración de partida (al inicio de la fase de eliminación). SF(Br) eliminó un 44% y LMT(PD), expuesta a 1 mg Cd/L, un 51%. LMT(PD) y P, expuestas a 0,5 mg/L, eliminaron 47 y 43 % respectivamente. Por último, en LMT(PD), LMT(B) y A, a 0,1 mg/L, el porcentaje fue de 41%, 40% y 23% respectivamente. Hay que mencionar que, en algunas de esta poblaciones la fase experimental correspondiente a la eliminación se prolongó hasta 7 días, manteniéndose la eliminación a lo largo de estos 4 días adicionales.

Los parámetros cinéticos  $K_u$ ,  $K_e$ ,  $t$  de vida media y  $BCFs$  muestran resultados similares a los encontrados en LMT(PD) (tablas 3.3. y 3.4.). De nuevo, se observa la dependencia de la constante de acumulación respecto a la concentración de exposición, así como la dependencia de la constante de eliminación con la concentración de cadmio, previamente acumulado en la fase de acumulación, característica, esta última, de la cinética de primer orden asumida en nuestro modelo. Si comparamos los valores de estas constantes con los obtenidos para LMT(PD) a las mismas concentraciones encontramos, entre parejas, valores similares de  $K_a$ ,  $K_e$  (figuras 3.11 y 3.12). Sin embargo, la pareja P y LMT(PD) a 0,5 mg Cd/L sí muestra valores distintos en sus constantes de acumulación y eliminación, con intervalos de confianza que no se solapan.



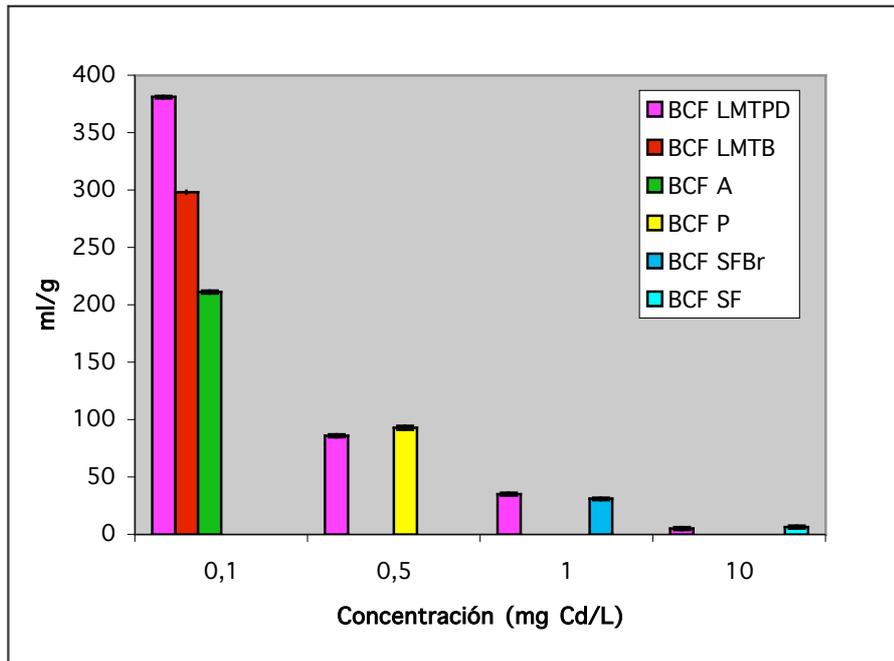
**Figura 3.11.** Tasas de acumulación estimadas por el modelo cinético en las poblaciones de *Artemia* estudiadas en función de la concentración de cadmio en el agua.

En cuanto a los BCFs (figura 3.13), observamos que LMT(PD) y SF presentaron valores de BCFs muy similares (5,1 y 6,5), así como los valores de las dos constantes de acumulación y eliminación. En el caso de SF(Br) y LMT(PD), ocurre lo mismo (31,2 y 35,3 respectivamente). LMT(PD) y P, a pesar de las diferencias en sus constantes de velocidad, presentan también valores parecidos en sus BCFs (86,1 y 93). Por último, LMT(PD), LMT(B) y A, aunque con BCFs diferentes, están dentro del mismo orden de magnitud.



**Figura 3.12.** Tasas de eliminación obtenidas a partir del modelo cinético en las poblaciones de *Artemia* estudiadas, en función de la concentración de cadmio en el agua.

El modelo de regresión no lineal empleado para ajustar los datos experimentales, (figuras 3.3 y 3.9) describe razonablemente bien el comportamiento de acumulación y eliminación de cadmio en *Artemia*, como se puede ver a partir de los coeficientes de regresión ( $R^2$ ) que se obtienen de los ajustes. La disponibilidad de un modelo que se ajustara a los valores observados de acumulación-eliminación nos ha permitido también comparar, en conjunto, las poblaciones expuestas a la misma concentración de exposición mediante el test de la F de Snedecor (tabla 3.5).



**Figura 3.13.** Factores de bioconcentración (BCF) obtenidos a partir del modelo cinético en las poblaciones de *Artemia* estudiadas en función de la concentración de cadmio en el agua.

Como se observa en la tabla 3.5, sólo el modelo que describe la acumulación-eliminación de la población de *A. persimilis*, expuesta a 0,1 mg/L de cadmio, resultó significativamente diferente a los de las otras dos poblaciones expuestas a la misma concentración, LMT(PD) y LMTB.

En cuanto a los factores de bioconcentración (BCFs), calculados a partir de las estimas de las constantes de velocidad, cabe destacar, en primer lugar que en la mayoría de los casos se aproximan adecuadamente a los BCFs obtenidos a partir de los datos experimentales en el estado de equilibrio, calculados según Taylor (1983). Sin embargo, aunque desconocemos las razones, hay algunas poblaciones en que se dan mayores diferencias entre los BCFs "experimentales" y los calculados a partir de las estimas del modelo. En general, existe menor grado de aproximación entre los valores de BCFs "experimentales" y los calculados a partir de las estimas del modelo cuando las poblaciones son expuestas a pequeñas concentraciones de metal, donde los BCFs son mayores.

También realizamos los contrastes de BCFs por parejas de poblaciones expuestas a la misma concentración (tabla 3.6).

Los contrastes confirmaron que no existían diferencias entre la mayoría de las poblaciones, excepto LMT(PD) con LMT(B) y A, expuestas a 0,1 mg/L de Cd. Las mayores diferencias parecen existir entre LMT(PD) y A, como ya habíamos visto en los contrastes del modelo (tabla 3.5).

**Tabla 3.5.** Contrastes de modelos de acumulación-eliminación en poblaciones expuestas a la misma concentración.

Pareja	Concentración (mg Cd/L)	F	Nivel significación
LMT (PD)-SF	10,0	1,30	0,2936 >0,05
BLMT(PD)-SFB <sub>r</sub>	1,0	0,86	0,4939 >0,05
LMT(PD)-P	0,5	1,07	0,3622 >0,05
LMT(PD)-LMT(B)-A	0,1	12,82	0,0000 <0,05*
LMT(PD)-LMT(B)	0,1	2,94	0,0704 >0,05
LMT(B)-A	0,1	12,85	0,0002 <0,05*
LMT(PD)-A	0,1	18,4	0,0000 <0,05*

\*Diferencias entre poblaciones mediante el test de F de Snedecor para un nivel de significación de 0,05.  
([http://department.obg.cuhk.edu.hk./ResearchSuppot/F\\_Test.asp](http://department.obg.cuhk.edu.hk./ResearchSuppot/F_Test.asp))

**Tabla 3.6.** Contrastes de BCFs en poblaciones expuestas a la misma concentración basado en Bayler *et al.* (2000). RATIO = Proporción entre los BCFs correspondientes a las poblaciones de cada pareja. IC sup= intervalo de confianza superior de la proporción entre los BCFs de cada pareja. IC inf= intervalo de confianza inferior de la proporción entre los BCFs de cada pareja.

Poblaciones	Concentración (mg Cd/L)	IC sup	IC inf	Proporción
LMT (PD)-SF	10,0	1,7476	0,9238	1,2706
LMT(PD)-SFB <sub>r</sub>	1,0	1,0599	0,7363	0,8834
LMT(PD)-P	0,5	1,8316	0,6402	1,0828
LMT(PD)-LMT(B)	0,1	0,9740	0,6291*	0,7828
LMT(B)-A	0,1	2,0018	0,9958	1,4119
LMT(PD)-A	0,1	0,7962	0,3860*	0,5544

(\*) diferencias significativas entre los BCFs de cada pareja.

### 3.4.- DISCUSIÓN

En este estudio se ha utilizado un modelo de dos compartimentos (el agua de exposición como primer compartimento y *Artemia*, como segundo) y cinéticas de primer orden para evaluar y comparar la acumulación y eliminación de cadmio en *Artemia*. Cuando el periodo de exposición es lo suficientemente prolongado, se alcanza el estado de equilibrio (la curva adquiere forma de meseta). Entonces, las constantes de acumulación y eliminación pueden estimarse mediante ajustes de regresión no-lineal (Landrum *et al.*, 1992). Además, ambas constantes pueden ser estimadas a la vez a partir, tanto de la fase de acumulación, como de la de eliminación (Landrum *et al.*, 1992; Zauke *et al.*, 1995). Los ajustes de nuestros valores experimentales a los predichos por el modelo presentan coeficientes de determinación (0,62-0,90) que indican la bondad del ajuste y nos permiten aceptar que una gran proporción de la varianza queda explicada por el modelo.

El modelo describe como, en la fase inicial del proceso de acumulación de cadmio en *Artemia*, el aumento de los niveles de cadmio en este crustáceo es lineal y directamente proporcional a la concentración en el agua. Conforme la concentración en el animal aumenta, la acumulación neta disminuye hasta que llega a ser 0. Es decir, hasta que se alcanza un estado de equilibrio dinámico en el que las tasas de acumulación y eliminación se compensan. La existencia de estado de equilibrio también puede indicar la participación de algún mecanismo de transporte facilitado para el cadmio. Dicho mecanismo estaría limitado por el número de transportadores y por la velocidad a la que funciona, tal como ha sido sugerido en *Artemia franciscana* para el cobre (Blust *et al.*, 1991).

En la tabla 3.3 se puede observar una relación directamente proporcional entre la tasa de eliminación  $K_e$  y la concentración de cadmio en el animal  $C_{ae}$ , tal como cabría esperar en un mecanismo que sigue una cinética de primer orden.

Los tiempos de exposición al metal, necesarios para que se alcance el estado de equilibrio calculados por el modelo, coinciden con los tiempos en que éste se ha alcanzado experimentalmente.

También existe un buen grado de coincidencia entre los BCFs calculados directamente a partir de los datos experimentales según Taylor (1983) y los

obtenidos a partir de los parámetros estimados por el modelo, de forma que no sólo están dentro del mismo orden de magnitud sino que además son muy semejantes (tablas 3.3 y 3.4).

Sin embargo, existen algunas objeciones en la aplicación de este tipo de modelos cinéticos. En primer lugar, somos conscientes de que los modelos que representan al organismo como un sólo compartimento siempre serán insuficientes para describir la cinética multicompartimental que, en realidad, tiene lugar en un organismo vivo, en el que el cadmio se distribuirá de forma diferencial entre los diferentes órganos, tejidos, orgánulos, etc... Sabemos, por tanto, que el cadmio presente en estos compartimentos no va a constituir un acervo común y, por tanto, no va a estar igualmente disponible para la eliminación. Además, la naturaleza condicional de los coeficientes de velocidad usados en todos estos modelos debe ser también tenida en cuenta a la hora de valorar los resultados obtenidos. Dado que numerosos factores ambientales y fisiológicos pueden modificar la cinética del tóxico, condiciones diferentes de experimentación podrían dar lugar a diferentes constantes de velocidad.

Otra de las objeciones que se ha hecho a la aplicación del ajuste de curvas no-lineales en modelos cinéticos, se refiere a que estos modelos no permiten distinguir si la asíntota en la curva de acumulación que representa el estado de equilibrio se debe a la eliminación o contiene otros factores que contribuyen a la reducción de la asimilación como, por ejemplo, una disminución de la biodisponibilidad (Landrum *et al.*, 1992).

La limitación de tamaño con la que nos encontramos al abordar el estudio de la cinética de cadmio en *Artemia* no nos permite plantear un enfoque multicompartimental. Esta es una de las razones por la que la acumulación de metales en especies de pequeño tamaño se ha abordado, generalmente, utilizando modelos bicompartimentales con cinéticas de primer orden (Lotufo *et al.*, 2000). No obstante, los resultados obtenidos al aplicar los modelos cinéticos bicompartimentales han sido muy útiles desde un punto de vista práctico, teniendo en cuenta que los modelos son una descripción matemática y no una descripción de los procesos biológicos. Ejemplos de la aplicación de estos modelos para la

descripción de la cinética de metales en otros crustáceos de pequeño tamaño los encontramos en los trabajos de Xu y Pascoe (1993) y Zauke *et al.* (1995).

Como podemos apreciar en la tabla 3.3, en LMT(PD), los valores de la concentración de cadmio alcanzada en el animal en el estado de equilibrio ( $C_{ae}$ ), se mantienen en un rango estrecho (35,3 a 38,1  $\mu\text{g/g}$ ) con independencia de la concentración de cadmio en el agua (0,1-1 mg/L), excepto en el caso de la exposición a 10 mg/L, en que esta concentración es algo superior (51  $\mu\text{g/g}$ ). Esto nos permite proponer un comportamiento cadmio-regulador en *Artemia*, al menos dentro del rango de 0,1 a 1 mg Cd/L. Puesto que:

$$C_{ae} = (K_a/K_e) \cdot C_w$$

la constancia de  $C_{ae}$ , al aumentar 10 veces el valor de  $C_w$ , cabe ser explicada como consecuencia de una variación compensatoria de  $K_a$  y/o  $K_e$ . En la tabla 3.3 se observa que en el rango de concentraciones de 0,1 a 1 mg Cd/L los valores de  $K_e$  no son estadísticamente diferentes. Sin embargo, se observa una clara tendencia de disminución del valor de  $K_a$  con la concentración de cadmio presente en el agua. Es decir, las tasas de captación ( $K_a$ ) en mL de agua "aclarada" por gramo y hora están inversamente relacionadas con la concentración de cadmio en el agua.

Teniendo en cuenta la relación entre la tasa de captación ( $K_a$ ), la tasa de aclaramiento (CR) y la tasa de asimilación  $\square$ :

$$K_a = \square \cdot CR$$

y que la constante de acumulación se relaciona con la tasa de entrada de metal (I) y la concentración en el agua ( $C_w$ ) según:

$$I = K_a \cdot C_w$$

y asumiendo, como proponen otros autores (Navarro *et al.*, 1993; Spicer, 1995; Rainbow, 1998), que *Artemia* es extremadamente impermeable a los metales y que éstos tienen como principal vía de entrada el epitelio digestivo, éstos resultados sugieren que existe un efecto del tóxico sobre la tasa de bebida (CR), de manera

que, a mayores concentraciones de cadmio en el agua, en el animal se reduce dicha tasa o bien se produce algún fenómeno que disminuye la eficiencia de absorción ( $\square$ ). Puesto que en el paso del metal a través del epitelio participan mecanismos de transporte activo y de difusión facilitada (Blust *et al.*, 1992), estos mecanismos podrían verse también negativamente afectados como consecuencia de la presencia de metal.

En todo caso, podemos asegurar que la disminución de  $K_a$  al aumentar la concentración de cadmio en el medio no conduce a una variación apreciable en la tasa de entrada de metal ( $I$ ) en el rango de 0,1 a 1 mg de Cd/L.

Generalmente, se acepta que los organismos pueden presentar tres estrategias principales para eludir la acción tóxica del cadmio: 1) la reducción de la entrada de metal; 2) el aumento de la excreción o 3) el secuestro del metal dentro de los tejidos en forma no tóxica para el organismo. Según nuestros resultados, parece que los individuos de LMT(PD) restringen la entrada de metal, puesto que la tasa de entrada de cadmio al organismo ( $I$ ) se mantiene constante en el rango de concentraciones de 0,1 a 1 mg/L, si bien la disminución de la constante de captación ( $K_a$ ) con el aumento de concentración en el agua, tal como hemos dicho anteriormente, puede ser el reflejo de una menor entrada de agua y/o una menor tasa de asimilación del metal.

Aunque en las condiciones experimentales empleadas hemos asumido que la principal vía de entrada de cadmio en *Artemia* fue la absorción por el epitelio digestivo a partir del agua de bebida, no se descarta que pueda existir cierta acumulación a partir del fitoplancton que se añadió al mismo tiempo que el metal en cada renovación del medio, ni que se haya producido cierta adsorción de cadmio sobre de los filópodos. Nimo *et al.* (1977) (citada en Taylor (1983)), estudiando la influencia de las vías de asimilación, agua o alimento en la acumulación del cadmio en *Palaemonetes*, concluyó que sería necesario concentrar el cadmio 15.000 veces más en el alimento para producir el mismo efecto que a través del agua. Nuestro diseño experimental se ha basado en la acumulación procedente del agua, por ser ésta la vía más sencilla de administración.

Hemos observado en las poblaciones estudiadas que la asimilación aumenta hasta que se alcanza cierta concentración en los tejidos. Jennings y Rainbow (1979), en un trabajo con, supuestamente *A. salina* (en realidad es una población de *Artemia* de la que no se menciona su origen), encuentra también esta relación con la concentración del medio. Chen y Liu (1987) también describen este fenómeno en nauplios de *A. franciscana* expuestas de 0,05 a 1 mg/L de Cd, que son capaces de acumular este metal hasta 10 veces la concentración del medio. Esta proporcionalidad se ha descrito también en otros invertebrados expuestos a metales pesados (Ray, 1984; White y Rainbow, 1986).

Las tasas de entrada de metal en *Artemia*, teniendo en cuenta todas las poblaciones y todas las concentraciones de cadmio ensayadas, son más bajas (0,1 a 1,5  $\mu\text{g Cd}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ) que las encontradas en otros trabajos. Zauke *et al.*, (1995) encuentra valores de 1 a 4  $\mu\text{g Cd}/(\text{g}\cdot\text{h})$  en gammáridos.

En nuestros experimentos, todas las poblaciones de *Artemia* estudiadas eliminaron cadmio de una forma significativa al ser transferidas a agua limpia, llegando a eliminar entre el 23% y 64% del cadmio acumulado tras tres días en agua exenta de metal. Sin embargo, los porcentajes de cadmio eliminado no reflejan toda la complejidad del proceso de eliminación, ya que no sólo tiene importancia el porcentaje de cadmio eliminado, sino también la rapidez con que se elimina. Clásicamente, en toxicología se ha utilizado el tiempo de vida media biológico ( $t_{1/2}$ ) para comparar la persistencia de una sustancia en diferentes organismos, siempre referido a la constante de eliminación y a un compartimento específico del animal. En nuestros resultados, los valores de vida media calculados están entre poco más de un día y 6 días (de 32 a 139 h). Los valores estimados de tiempo de vida media del cadmio, en invertebrados, están en torno a 2-53 días (AMAP, 1998). Aunque estos valores dependen siempre de la concentración de cadmio de partida, son valores bajos dentro del grupo de los invertebrados y demuestran una persistencia no muy alta o una eliminación eficiente del cadmio en *Artemia*. Van Hattum *et al.* (1989) encontraron en *Asellus aquaticus*, expuesto a cadmio,  $t_{1/2}$  de 22 días, y Zauke *et al.* (1995) encontró valores de,

aproximadamente, 43 h en distintas especies de gammaridos marinos. Estos valores están dentro del mismo orden que los obtenidos por nosotros.

Zauke *et al.* (1995) afirmaron que los organismos que no presentan un estado de equilibrio pueden considerarse como acumuladores netos. De esta manera, podríamos pensar en *Artemia* como un organismo capaz de regular, en cierta medida, su contenido de cadmio acumulado. Sin embargo, Rainbow (1998) define *Artemia* como un acumulador neto porque, a pesar de eliminar, no logra desprenderse de todo el cadmio acumulado, siempre queda cierta cantidad de cadmio en sus tejidos. Según este mismo autor, los animales pueden diferenciarse en función de su comportamiento desde el punto de vista de los procesos de acumulación/eliminación: acumuladores (que no llegan a alcanzar un estado de equilibrio), reguladores (que mantienen más o menos constante una concentración de metal en el cuerpo por medio de un balance entre las tasas de acumulación y eliminación) y reguladores parciales (con diferentes grados de acumulación neta cuando la tasa de acumulación supera a la de eliminación).

Ya hemos destacado anteriormente el grado de coincidencia de los BCFs calculados a partir de nuestros datos experimentales en el estado de equilibrio (Taylor, 1983) y los BCFs estimados por el modelo. Los BCFs han sido, clásicamente, utilizados como referencia para evaluar el potencial tóxico y la persistencia de las sustancias contaminantes en el medio acuático. Sin embargo, y a pesar del reciente desarrollo de métodos estadísticos para comparar BCFs de tóxicos en diferentes organismos (Bailer *et al.*, 2000), el valor indicador de este parámetro tiene importantes limitaciones (Chapman *et al.*, 1996), entre las cuales destacaríamos que los valores de BCF para el caso de los metales, dependen de la concentración de tóxico en el agua, tal como se ha visto para el cadmio en LMT(PD). Existen muchos datos disponibles de acumulación de cadmio expresados de esta forma para distintas especies de invertebrados acuáticos. Sin embargo, la comparación de BCFs es problemática como consecuencia de las distintas condiciones de experimentación empleadas, entre las que cabe destacar la vía de administración, agua (BCF) o alimento (BAF). Además, en unas ocasiones los

valores se expresan en función del peso húmedo y en otras en función del peso seco.

Los BCFs calculados en LMT(PD) representan el rango mayor de BCFs encontrados en nuestras poblaciones de *Artemia* estudiadas y alcanzan valores entre 5 y 381. Estos valores son pequeños comparados con los encontrados en otros organismos. En garrínidos, los valores están entre 0,4 y 7513 mL/g (Zauke *et al.*, 1995). Los valores de BCFs para el cadmio que hemos encontrado en *Artemia* están entre los valores más bajos dentro del grupo de crustáceos, al compararlos con los presentados por Taylor (1983).

Aunque existen numerosos estudios en *Artemia* relacionados con la toxicidad de todo tipo de sustancias, son muy escasos los que abordan el estudio de su acumulación (Hadjispyrou *et al.*, 2001). Sin embargo, nosotros consideramos que el estudio de la cinética de acumulación y eliminación de cadmio en diferentes poblaciones es imprescindible para comprender la acumulación y toxicidad de este metal en el género *Artemia*. La diversidad del género ha facilitado la posibilidad de disponer de un número considerable de especies/poblaciones cuyo estudio en el laboratorio permite comparaciones interespecíficas e intraespecíficas sin que intervengan los factores naturales que pudieran confundir los resultados.

A pesar de que las poblaciones comparadas tienen diferente patrón reproductivo, diferente ploidía y origen geográfico, su comportamiento, en cuanto a la acumulación de cadmio, parece muy conservado en el género. Los contrastes estadísticos de los modelos correspondientes a parejas de poblaciones expuestas a la misma concentración de cadmio revelaron que no había diferencias entre la mayoría de las poblaciones, excepto en las tres expuestas a 0,1 mg Cd/L, LMT(PD), LMT(B) y A, siendo esta última población diferente a las otras dos. Al analizar los parámetros cinéticos relevantes se puede apreciar que A se diferencia de las otras dos poblaciones, sobre todo, en la constante de acumulación que para ella predice el modelo, que es menor que la predicha para las otras dos poblaciones. Esto tiene como consecuencia que A presente un BCF menor, ya que la constante de eliminación fue similar a las otras dos poblaciones. LMT(B) y LMT(PD) son significativamente diferentes en cuanto a los valores de BCFs que el modelo

genera, aunque no lo son al considerar el modelo en su conjunto (hay que hacer notar que el valor de  $p$  en este último caso, 0,07, es sólo ligeramente superior al nivel de significación elegido, 0,05). El resto de poblaciones tuvieron un comportamiento similar a LMT(PD) tanto en el modelo en su conjunto como en cuanto a los valores de BCF.

Las concentraciones de cadmio alcanzadas en organismos pertenecientes a poblaciones de una misma especie o especies relacionadas pueden variar debido a diferencias en las rutas de entrada y eliminación del metal y en la forma de almacenamiento, así como a diferencias en la permeabilidad de sus tegumentos para el metal, en los ligandos que lo unen y en las tasas metabólicas. No hay que olvidar que las diferencias fisiológicas, anatómicas, ecológicas y de comportamiento descritas para las distintas poblaciones de *Artemia* estudiadas podrían contribuir a esta variabilidad (Browne, 1992). Sin embargo, como hemos mencionado anteriormente, la acumulación del cadmio en *Artemia* no presenta gran variabilidad, al menos en las poblaciones estudiadas.

*Artemia* es un animal eurihalino, regulador hipo-hiperosmótico. Los adultos hacen pasar el agua marina como agua de bebida, que les proporciona un exceso de iones que eliminan a través de las branquias. Blust *et al.* (1992) demostraron que *A. franciscana* varía su permeabilidad al cadmio como consecuencia de la aclimatación a diferentes salinidades. Tal como dijimos en el capítulo anterior, *A* procede de salinas interiores con una composición iónica muy peculiar. No podemos, por tanto, descartar que las diferentes adaptaciones ecológicas de *A* a su medio original hayan conducido a diferencias en la permeabilidad para el cadmio y que esta sea la razón de una distinta cinética de acumulación de cadmio.

En este punto, podríamos resumir diciendo que, aunque evidentemente simplista desde el punto de vista fisiológico, los modelos cinéticos son, sin duda, útiles para ayudarnos a describir el proceso de acumulación-eliminación de cadmio en *Artemia*. Pueden proporcionar información de cómo se produce la acumulación, hasta qué concentración acumula, si es capaz de regular la concentración con la adquisición de un estado de equilibrio, si elimina significativamente y qué forma tiene la curva de eliminación. Además, nos permite poner de manifiesto de una forma cuantitativa

las diferencias entre las poblaciones del género en función de algunos de los parámetros cinéticos relevantes que describen matemáticamente estos procesos.

### 3.5.- BIBLIOGRAFIA

- AMAP (1998). AMAP Assessment Report: Artic Pollution Issues. Oslo, Noruega, AMAP.
- Amat, F. (1985). "Biología de *Artemia*." *Inf. Tecn. Inst. Inv. Pesq.* **127**: 3-60.
- Bailer, A. J., Walker, S. E. y Venis, K. J. (2000). "Estimating and testing bioconcentration factors." *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**(9): 2338-2340.
- Barron, M. G., Stehly, G. R. y Hayton, W. L. (1990). "Pharmacokinetic modeling in aquatic animals. I. Models and concepts." *Aquatic Toxicology* **18**: 61-86.
- Blust, R., Fontaine, A. y Declair, W. (1991). "Effect of hydrogen ions and inorganic complexing on the uptake of copper by the brine shrimp *Artemia franciscana*." *Marine Ecology Progress Series* **76**: 273-282.
- Blust, R., Kockelbergh, E. y Baillieul, M. (1992). "Effect of salinity on the uptake of cadmium by the brine shrimp *Artemia franciscana*." *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **84**: 245-254.
- Brown, M. T. y Depledge, M. H. (1998). Determinants of trace metal concentrations in marine organisms. Metal metabolism in aquatic environments. Langston, W. J. y Bebianno, M. J. London, Chapman & Hall: 185-217.
- Browne, R. A. (1992). "Population genetics and ecology of *Artemia*: Insights into parthenogenetic reproduction." *Trends in Ecology and Evolution* **7**(7): 232-237.
- Byrne, R. H., Kemp, L. R. y Cantrell, K. J. (1988). "The influence of temperature and pH on trace metal speciation in seawater." *Marine Chemistry* **25**: 163-181.
- Chapman, P. M., Allen, H. E., Godtfredsen, K. y Z'Graggen, M. N. (1996). "Evaluation of Bioaccumulation factors in regulating metals." *Environmental Science and Technology/News* **30**(10): 448-452.
- Chen, J. C. y Liu, P. C. (1987). "Accumulation of heavy metals in the nauplii of *Artemia salina*." *Journal of the World Aquaculture Society* **18**(2): 84-93.
- Depledge, M. H. y Rainbow, P. S. (1990). "Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates." *Comparative Biochememistry and Physiology* **97C**(1): 1-7.
- Hadjispyrou, S., Kungolos, A. y Anagnostopoulos, A. (2001). "Toxicity, bioaccumulation, and interactive effects of organotin, cadmium, and chromium on *Artemia franciscana*." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **49**(2): 179-186.
- Jenner, H. A., Hemelraad, J., Marquenie, J. M. y Noppert, F. (1991). "Cadmium kinetics in freshwater clams (Unionidae) under field and laboratory conditions." *Science Of The Total Environment* **108**(3): 205-214.

- Jennings, J. R. y Rainbow, P. S. (1979). "Accumulation of cadmium by *Artemia salina*." *Marine Biology* **51**(1): 47-54.
- Landrum, P. F., Lee, H. y Lydy, M. J. (1992). "Toxicokinetics in aquatic systems: model comparisons and use in hazard assessment." *Environmental Toxicology and Chemistry* **11**: 1709-1725.
- Lotufo, G. R., Landrum, P. F., Gedeon, M. L., Tigue, E. A. y Herche, L. R. (2000). "Comparative toxicity and toxicokinetics of DDT and its major metabolites in freshwater amphipods." *Environmental Toxicology and Chemistry* **19** (2): 368-379.
- Mas, A. y Azcue, J., Eds. (1993). Metales en sistemas biológicos. Barcelona, Promociones y publicaciones universitarias, S.A.
- Navarro, J. C., Ireland, J. y Tytler, P. (1993). "Effect of temperature on permeability and drinking rates of the metanuplii of the brine shrimp." *Marine Biology* **112**(2): 247-250.
- Quinn, G. P. y Keough, M. J. (2002). Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge, Cambridge University Press.
- Rainbow, P. S. (1997). "Trace metal accumulation in marine invertebrates: marine biology or marine chemistry?" *Journal of Marine Biology Association* **77**: 195-210.
- Rainbow, P. S. (1998). Phylogeny of trace metal accumulation in crustaceans. Metal Metabolism in Aquatic Environments. Langston, W. J. y Bebianno, M. J. London, Chapman and Hall. **9**: 285-313.
- Rand, G. M. (1995). Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment, Taylor & Francis.
- Rand, G. M. y Petrocelli, S. R., Eds. (1985). Fundamentals of aquatic toxicology. New York, Hemisphere.
- Ray, S. (1984). "Bioaccumulation of cadmium in marine organisms." *Experientia (Basel)* **40**(1): 14-23.
- Roesijadi, G. (1992). "Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals." *Aquatic Toxicology* **22**: 81-114.
- Spicer, J. I. (1995). "Effect of water-borne copper on respiratory and cardiac function during early ontogeny of the brine shrimp, *Artemia franciscana* Kellogg 1908 (Branchiopoda: Anostraca)." *Journal of Comparative Physiology B*. **165**: 490-495.
- Taylor, D. (1983). "The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organism." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **7**: 33-42.
- Torreblanca, A., Diaz-Mayans, J. y Del Ramo, J. (1993). "Acumulación de metales". Metales en sistemas biológicos. Barcelona, Promociones y Publicaciones Universitarias, S.A. pp. 257-274.
- Van Hattum, B., De Voogt, P., Van Den Bosch, L., Van Straalen, N. M. y Jooisse, E. N. G. (1989). "Bioaccumulation of cadmium by the freshwater isopod *Asellus aquaticus* (L.) from aqueous and dietary sources." *Environmental Pollution* **62**(2-3): 129-152.

- Wang, W. X. (2001). "Comparison of metal uptake rate and absorption efficiency in marine bivalves." *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(6): 1367-1373.
- White, S. L. y Rainbow, P. S. (1986). "Accumulation of cadmium y *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda)." *Marine Ecology* **32**: 17-25.
- Wright, D. A. y Welbourn, P. M. (1994). "Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota." *Environmental Review* **2**: 187-214.
- Xu, Q. y Pascoe, D. (1993). "The Bioconcentration of Zinc by *Gammarus pulex* (L) and the Application of a Kinetic Model to Determine Bioconcentration Factors." *Water Research* **27**(11): 1683-1688.
- Zauke, G. P., VonLemm, R., Meurs, H. G. y Butte, W. (1995). "Validation of estuarine gammarid collectives (Amphipoda: Crustacea) as biomonitors for cadmium in semi-controlled toxicokinetic flow-through experiments." *Environmental Pollution* **90**(2): 209-219.

# 4

## NIVELES DE METALOTIONEÍNA EN *Artemia*

### 4.1.- INTRODUCCIÓN

Las metalotioneínas (MT) son proteínas de bajo peso molecular con un alto contenido de metal y azufre. Fueron descritas por primera vez por Margoshe y Vallee en 1957 en riñón de caballo. Estos autores demostraron que estas proteínas eran responsables de la acumulación de metal en el riñón. Actualmente, el término "metalotioneína" se usa para designar una serie de moléculas bien conocidas que muestran un gran número de similitudes estructurales y funcionales con la MT de riñón de caballo anteriormente mencionada (Kojima *et al.*, 1999). Son proteínas que están ampliamente distribuidas, presentes en procariotas, protistas, hongos, plantas y animales (Kägi y Kojima, 1987). Las MTs tienen una serie de propiedades que las distinguen fácilmente del resto de proteínas (Kägi y Schäffer, 1988). Se presentan, principalmente, en el citoplasma celular, pero también se han detectado en el núcleo y en los lisosomas. Aunque están presentes en diferentes tejidos, se encuentran predominantemente en el hígado y riñón de vertebrados, y en la glándula digestiva e intestino de invertebrados (Roesijadi, 1992). Existe mucha información sobre las metalotioneínas de los mamíferos, la mayoría está recogida en algunas revisiones recientes (Klaasen *et al.*, 1999; Miles *et al.*, 2000).

En cuanto a su estructura y propiedades moleculares, las metalotioneínas se caracterizan por presentar un bajo peso molecular (6-10 kD) y una secuencia de 61 ó 62 aminoácidos, con una elevada proporción de cisteína, que representa entre un 20 y 30% de los residuos de aminoácidos totales (un total de 20 cisteínas). Carecen de aminoácidos aromáticos y, en el caso de presentarlos, su número es bajo. Son

termoestables y solubles en agua. La proteína es capaz de unir estrecha y específicamente cationes como  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  mediante los átomos de azufre de los residuos de cisteína. Cada uno de estos metales puede, así, formar complejos tiolato-metal (mediante un enlace mercáptido), los cuales tienen un espectro de absorción típico en el rango de luz U.V. (Cu: 270 nm, Cd: 254 nm, Zn: 220 nm). Su fuerte capacidad de unión al metal presenta diferente afinidad, según el metal considerado:  $\text{Ag}^+ = \text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^+ > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ . Presentan un elevado grado de similitud en su secuencia de aminoácidos y una posición muy conservada de los residuos de cisteína, con una alta proporción de repetición de la secuencia cys-x-cys, donde x es un aminoácido distinto a la cisteína.

Aunque, normalmente, se expresa en un nivel basal bastante bajo, la síntesis de MT puede ser inducida por una gran variedad de estímulos: metales, hormonas, toxinas, estrés, etc (Klaassen *et al.*, 1999). La síntesis de MT está regulada homeostáticamente. En el caso de los mamíferos está codificada por una familia de genes que incluye genes funcionales y pseudogenes no funcionales (Hammer, 1986).

La inducción de la síntesis de MT requiere la participación de unas secuencias específicas de ADN, denominadas MRE (elementos de respuesta al metal), que son los sitios de unión de unos factores de transcripción encargados de la regulación de los metales. Los MREs están presentes en múltiples copias, en la región promotora de los genes (Hammer, 1986). La síntesis se inicia con la unión de los metales a inhibidores de los factores de transcripción, de forma que, tras la unión, dichos factores de transcripción quedan libres para unirse al promotor del gen y producir la síntesis de MTs que se unirán al exceso de metal (Palmiter, 1994). La expresión de las MTs puede verse alterada por cambios en la estructura del gen, como amplificación y metilación, y por la diferenciación y desarrollo celular.

En contraste con las bien conocidas propiedades estructurales de esta proteína, su función es todavía materia de discusión. Abundan los estudios que demuestran su implicación en la destoxificación de metales (Roesijadi, 1992; Klaassen *et al.*, 1999), en la protección de la célula contra el estrés oxidativo (Dalton *et al.*, 1996), en la proliferación celular (Miles *et al.*, 2000) y en el suministro de metales

esenciales a las células (control homeostático de la absorción y del metabolismo de cobre y zinc) (Cousins, 1985; Engel y Brouwer, 1987). Roesijadi (1992) sugiere que dicha función puede ser llevada a cabo por los niveles basales de MTs, mientras el exceso de éstos y de metales no esenciales, tóxicos para las células, provocaría la inducción de más MTs, que tendrían así un papel detoxificador en la célula. Sin embargo, los estudios realizados con ratones transgénicos que, o bien no expresaban los genes de estas proteínas o los sobreexpresaban, han llevado a la conclusión de que su ausencia da lugar a ratones con un fenotipo prácticamente normal (Masters *et al.*, 1994). Sólo provoca una disminución en la tolerancia a la toxicidad por cadmio cuando se presentan a la vez defectos en las proteínas transportadoras de cadmio. Por otra parte, la manifestación fenotípica de la sobreexpresión parece ser únicamente una protección extra para la toxicidad del cadmio (Liu *et al.*, 1995; Palmiter, 1999).

Una de las MT de invertebrados más exhaustivamente purificada y caracterizada es la del crustáceo *Scylla serrata* (Otvos *et al.*, 1982). Esta MT tiene dos isoformas y la secuencia de aminoácidos es similar a las formas de mamíferos, especialmente en la disposición de las cisteínas. En mamíferos, las MTs presentan una estructura en dos agrupaciones o clusters,  $\square$  y  $\square$ , que unen 4 y 3 átomos de metal, respectivamente. La estructura caracterizada de *Scylla serrata*, y también la de otros crustáceos, presenta dos clusters iguales, equivalentes al tipo  $\square$  de mamíferos. Dado que se sabe que el dominio  $\square$  une al metal con mayor afinidad que el  $\square$ , esto explicaría las posibles diferencias funcionales entre las metalotioneínas de mamíferos y crustáceos (Roesijadi, 1992; Klaassen *et al.*, 1999).

La síntesis de MT en *Artemia* ante la exposición a cadmio se describió por primera vez en nauplios de *A. franciscana* (Jayasekara *et al.*, 1986; Acey *et al.*, 1989) y, más tarde, en adultos de la misma especie (Martínez *et al.*, 1991; Del Ramo *et al.*, 1993). La determinación cuantitativa de MT en *Artemia parthenogenética* LMT(PD) (Del Ramo *et al.*, 1995) mostró unos altos niveles de MT, así como una elevada respuesta de inducción de su síntesis ante la exposición al metal. El equipo de Roger Acey ha purificado las metalotioneínas de *A.*

*franciscana*, encontrando 4 isoformas, y está, actualmente, aislando el gen para alguna de ellas (comunicación personal).

Dado que, de las múltiples funciones propuestas para la MT, la más unánimemente aceptada en todos los organismos es la protección frente a la toxicidad del cadmio, en el presente capítulo hemos estudiado la variabilidad en cuanto a los niveles basales de MT y los niveles alcanzados tras la exposición a cadmio en las diferentes poblaciones estudiadas.

Por otra parte, la observación de una mortalidad superior de las hembras frente a los machos tras la exposición a cadmio (Varó *et al.*, 1998) nos ha llevado a considerar el factor sexo en este último capítulo.

## **4.2.- MATERIAL Y MÉTODOS**

Las poblaciones escogidas (a excepción de la población SF(Br)), así como la metodología utilizada para la eclosión de los quistes y mantenimiento de los cultivos fueron las mismas ya descritas en el capítulo anterior.

La exposición de las poblaciones de *Artemia* a cadmio (0,1 ó 0,5 µg Cd/L durante 96 h) se realizaron también en las mismas condiciones que las descritas en los experimentos del capítulo anterior.

### **4.2.1.- Preparación de las muestras**

Al final de la exposición se tomaron de 4 a 6 muestras de 10 individuos cada una, así como 10 mL del medio de cultivo para su posterior análisis. Tras la recolección, todas las muestras de *Artemia* fueron enjuagadas con agua destilada, pesadas y congeladas a -20 °C. A continuación, las muestras se homogeneizaron en una solución de sacarosa 0,25 M y, posteriormente, se centrifugaron a 20.000 g y 4 °C durante 20 minutos. Aunque la centrifugación a la que sometimos los homogenizados, 20.000 g durante 20 minutos, deja en el sobrenadante la fracción soluble y la fracción microsomal, de ahora en adelante y con el fin de simplificar la redacción, nos referiremos a dicho sobrenadante como "fracción soluble". Se extrajeron alícuotas de 750 µL de la fracción soluble que se utilizaron para medir el contenido de MT por el Método de Saturación por Plata (Scheuhammer y Cherian, -102-

1986), con algunas modificaciones (Del Ramo *et al.*, 1995). Para ello, las alícuotas de sobrenadante de las muestras se incubaron con 1 mL de una solución de 20 mg/L de plata durante 15 minutos a 20°C, con el fin de que la plata se una a la MT. A continuación, la plata no unida se eliminó de la solución mediante la adición de 200 µL de un hemolisado celular de sangre de conejo. El posterior tratamiento de las muestras con calor (100°C) durante 2 minutos produjo la precipitación de la hemoglobina (y de la plata unida a ella), así como de otras proteínas, con excepción de las MTs, que son termoestables. Las proteínas desnaturalizadas se eliminaron por centrifugación a 1000 g durante 5 minutos a 4°C. Con el fin de conseguir una exhaustiva eliminación de la plata libre en solución, el proceso desde la adición del hemolisado se repitió tres veces. Para el calibrado del ensayo se prepararon soluciones que contenían concentraciones crecientes de MT de riñón de caballo (de 1 a 16 µg MT/mL), que se sometieron al mismo tratamiento que las muestras. La plata que permaneció en la muestra tras el proceso corresponde a aquella unida a la MT y se determinó mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) a la llama. Paralelamente se realizaron determinaciones del contenido de cadmio en la fracción soluble de las mismas muestras mediante EAA.

#### 4.2.2.- Análisis estadístico

Para comparar los efectos de los factores: Tratamiento con cadmio, población y sexo, así como de sus interacciones, se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) de los contenidos de metalotioneína y de los contenidos de cadmio en la fracción soluble. En las poblaciones bisexuales LMT(B) y A, expuestas a 0,1 mg/L, se consideraron los factores tratamiento, sexo y población. Para el resto de poblaciones, las dos partenogénicas, P y LMT(PD), y la bisexual SF, expuestas a 0,5 mg/L, se analizaron los factores tratamiento y población, considerando sólo las hembras en la población bisexual. También se analizó la influencia del sexo sobre la acumulación del cadmio y sobre la síntesis de metalotioneína en esta última población.

En aquellos casos en que el test de ANOVA mostró diferencias significativas se utilizó el test *a posteriori* de Fisher PLSD de comparación de medias, con un nivel de significación del 95%.

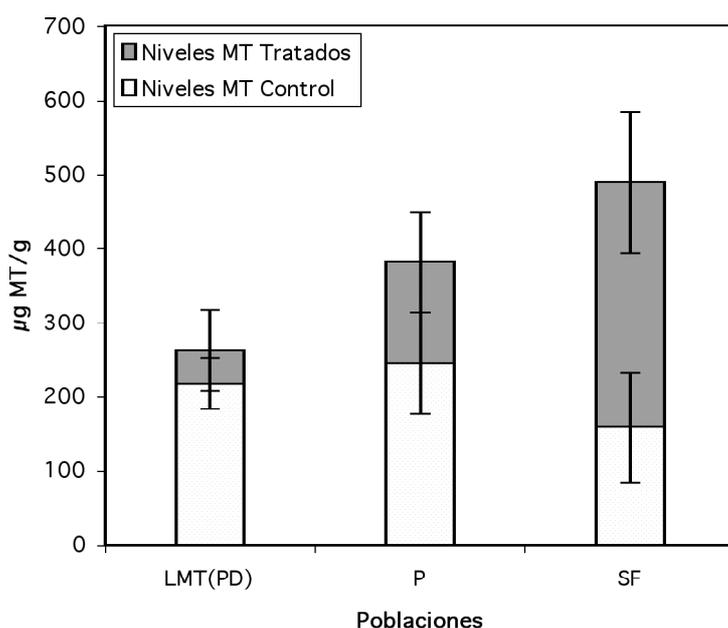
### 4.3.- RESULTADOS

#### 4.3.1.- Poblaciones expuestas a 0,5 mg Cd/L

En la tabla 4.1 se muestran las concentraciones de cadmio, niveles de MT, relación molar MT/Cd y relación molar MT inducida/Cd en la fracción soluble de muestras pertenecientes a las poblaciones SF, P y LMT(PD) tras 96 h. de exposición a 0,5 mg Cd/L y los valores determinados en los animales controles. Se considera que los valores de MT presentados por los animales controles corresponden al nivel basal o constitutivo en las condiciones de mantenimiento de las poblaciones, mientras que el incremento en contenido de MT presentada por aquellos animales expuestos a cadmio, corresponde a proteína cuya síntesis ha sido inducida por el metal. Para facilitar la interpretación de algunos de estos resultados también se muestran de forma gráfica en la figura 4.1.

**Tabla 4.1.** Valores medios  $\pm$  DE (n= 4-6) del contenido de cadmio ( $\mu\text{g}$  de Cd/g muestra) y del contenido de MT ( $\mu\text{g}$  de MT/g muestra), relación molar MT/Cd y relación molar MT inducida/Cd en la fracción soluble de muestras correspondientes a animales controles y a animales expuestos durante 96 h a 0,5 mg Cd/L. nd: por debajo del límite de detección; No ind: No inducción significativa.

Población	Tratamiento	Sexo	Niveles de cadmio	Niveles MT	Relación molar MT/Cd	Relación molar MT ind/Cd
SF	Control	M	nd	175,79 $\pm$ 70,27	---	---
		H	nd	158,73 $\pm$ 74,13	---	---
	Tratados	M	9,70 $\pm$ 2,13	84,16 $\pm$ 60,57	0,16	No ind.
		H	22,53 $\pm$ 1,97	488,94 $\pm$ 95,23	0,41	0,28
P	Control	H	nd	245,64 $\pm$ 68,82	---	---
	Tratados	H	9,21 $\pm$ 0,66	381,75 $\pm$ 67,72	0,78	0,28
LMT(PD)	Control	H	nd	217,67 $\pm$ 34,90	---	---
	Tratados	H	1,40 $\pm$ 0,49	261,89 $\pm$ 54,39	3,50	0,60



**Figura 4.1.** Niveles de MT basal e inducida en las poblaciones expuestas a 0,5 mg Cd/g durante 96 h

El análisis estadístico, mediante el test de ANOVA, de los niveles de cadmio en la fracción soluble (tabla 4.2) correspondiente a hembras de las tres poblaciones expuestas a cadmio, muestra que existe un efecto de la población. El ANOVA realizado con los valores correspondientes a SF mostró que existía un efecto significativo del sexo en lo que se refiere al contenido de cadmio en la fracción soluble (tabla 4.3). En la tabla 4.4 se presentan los resultados de los test *a posteriori* para aquellas parejas cuyas comparaciones son más relevantes.

**Tabla 4.2.** Tabla de ANOVA para los valores de contenido de cadmio de la fracción soluble en individuos de LMT(PD), P y hembras de SF expuestos durante 96 h a 0,5 mg Cd/L.

LMT(PD)-P-SF	NIVELES DE Cd			
FUENTE	gl	Suma de cuadrados	F	P
Población	2	1138,725	291,324	<0,0001*
Residual	11	21,498	--	---

(\*) Diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

**Tabla 4.3.** Tabla de ANOVA para los valores de contenido de cadmio en la fracción soluble, en individuos de SF expuestos durante 96 h a 0,5 mg Cd/L.

SF	NIVELES DE Cd			
FUENTE	gl	Suma de cuadrados	F	P
Sexo	1	395,197	95,522	<0,0001*
Residual	8	33,098	---	---

(\*) Diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

**Tabla 4.4.** Test de Fisher ( $p \leq 0,05$ ) para los niveles de cadmio en la fracción soluble en las poblaciones LMT(PD), P y hembras de SF expuestos durante 96 h a 0,5 mg /L de cadmio.

LMT(P)-P-SF	Dif. media	Dif. crítica	p
H Trat LMT(PD)- H Trat P	-7,804	2,176	< 0,0001*
H Trat LMT(PD)- H Trat SF	-21,124	1,986	< 0,0001*
H Trat P- H Trat SF	-13,320	1,986	< 0,0001*

(\*) Diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Los niveles de cadmio estuvieron por debajo del límite de detección en todos los individuos control. En las muestras correspondientes a animales expuestos a metal el contenido de cadmio varió desde 1,4  $\mu\text{g Cd/g}$  en LMT(PD) a 22,53 4  $\mu\text{g Cd/g}$  en las hembras de SF, resultando estadísticamente significativas las diferencias entre los valores medios de las tres poblaciones.

El ANOVA realizado con los valores de MT correspondientes a los diferentes grupos experimentales mostraron un efecto del tratamiento y de la población sobre este parámetro, así como la existencia de interacción entre ambos factores (Tabla 4.5). El análisis realizado con los grupos correspondientes a la población bisexual también mostró un efecto del sexo (Tabla 4.6).

**Tabla 4.5.** Tabla de ANOVA para los valores de contenido de MT de la fracción soluble en individuos de LMT(PD), P y hembras de SF expuestos durante 96 h a 0,5 mg Cd/L.

LMT(PD)-P-SF	NIVELES DE MT			
	gl	Suma de cuadrados	F	P
Tratamiento	1	195493,969	38,0	<0,0001*
Población	2	37068,008	3,6	0,0445*
Tratamiento x población	2	107222,647	10,4	0,0007*
Residual	22	113315,937	--	---

(\*) Diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

**Tabla 4.6.** Tabla de ANOVA para los valores de contenido de MT en la fracción soluble, de muestras correspondientes a individuos de SF expuestos durante 96 h a 0,5 mg Cd/L.

SF	NIVELES DE MT			
	gl	Suma de cuadrados	F	P
Tratamiento	1	75898,231	12,6	0,0023*
Sexo	1	200436,283	33,2	<0,0001*
Tratamiento x sexo	1	237263,354	39,4	<0,0001*
Residual	18	108518,570	---	---

(\*) Diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

El test *a posteriori* (tablas 4.7 y 4.8) mostró un aumento significativo de la concentración de MT tras la exposición a cadmio en las poblaciones de P y hembras de SF, mientras que, en LMT(PD), este aumento no fue significativo.

En cuanto a las diferencias entre poblaciones, los niveles basales de MT de las tres poblaciones no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre si. Sin embargo, tras la exposición a metal, sí que se hicieron patentes estas diferencias, que fueron significativas al comparar por parejas los valores medios correspondientes a las tres poblaciones. Las hembras de la población SF fueron las que mayor cantidad de MT indujeron, superando en 330  $\mu\text{g/g}$  los niveles de esta

proteína en los animales tratados con cadmio respecto de los animales controles (figura 4.1).

**Tabla 4.7.** Test de Fisher ( $p \leq 0,05$ ) para los niveles de MTs en la fracción soluble tras la exposición a 0,5 mg /L de cadmio en las poblaciones LMT(PD), P y hembras de SF.

LMT(PD)-P-SF	Dif. media	Dif. crítica	p
H Control LMT(PD)-H Trat LMT(PD)	-44,225	105,245	0,3929
H Control P-H Trat P	-136,109	105,245	0,0136*
H Control SF- H Trat SF	-330,213	85,932	< 0,0001*
H Control LMT(PD)-H Control P	-27,976	105,245	0,5870
H Control LMT(PD)-H Control SF	58,934	96,075	0,2166
H Control P-H Control SF	86,909	96,075	0,0740
H Trat LMT(PD)- H Trat P	-119,860	105,245	0,0275*
H Trat LMT(PD)- H Trat SF	-227,054	96,075	< 0,0001*
H Trat P- H Trat SF	-107,194	96,075	0,0304*

(\*) Diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

No encontramos diferencias significativas entre los niveles basales de MT de machos y hembras de la población SF. Tras la exposición al metal, las hembras mostraron un incremento de MT significativo, mientras que no hubo variación significativa en los machos (Tabla 4.8).

**Tabla 4.8.** Test de Fisher ( $p \leq 0,05$ ), para los niveles de MT en la fracción soluble de muestras de SF tras la exposición a 0,5 mg /L de cadmio.

SF	Dif. media	Dif. crítica	p
H Control -M Control	-17,059	94,181	0,7080
H Control -H Trat	-330,213	94,181	<0,0001*
M Control - M Trat	91,626	105,298	0,0842
H Trat - M Trat	404,779	105,298	< 0,0001*

(\*) Diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Se calculó, con fines exploratorios, la relación molar MT/Cd y la relación molar MT inducida/Cd a partir de los valores medios de metalotioneína y cadmio

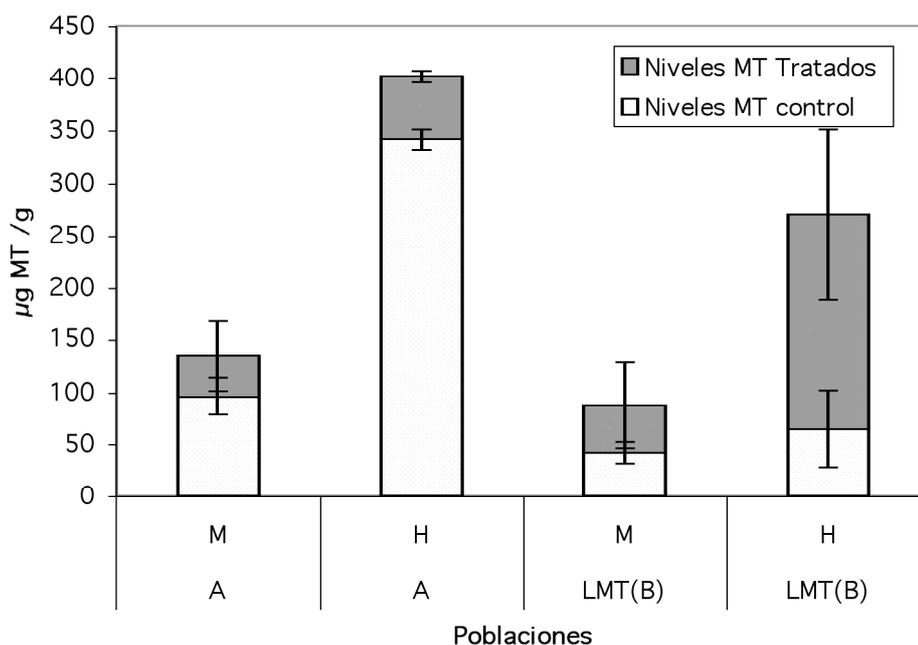
determinados para todos los grupos experimentales. La población de LMT(PD) fue la que mostró una relación molar MT/Cd mayor (3,5), valor muy superior al encontrado en el resto de poblaciones expuestas a 0,5 mg Cd/L (tabla 4.1). La relación molar de metalotioneína inducida/cadmio también fue mayor en LMT(PD) (0,60), mientras que en las hembras de P y SF, la relación fue de 0,28. En los machos de SF no se detectó inducción apreciable de MT tras la exposición a cadmio. Sin embargo, como podemos apreciar en la figura 4.1, las hembras de SF presentaron una mayor inducción de MT, en comparación con las hembras de las poblaciones partenogénéticas.

#### 4.3.2.- Poblaciones expuestas a 0,1 mg Cd/L

En la tabla 4.9 se muestran las concentraciones de cadmio, niveles de MT, relación molar MT/Cd y relación molar MT inducida/Cd en la fracción soluble de muestras pertenecientes a las poblaciones LMT(B) y A tras 96 h. de exposición a 0,1 mg Cd/L y los correspondientes valores determinados en los animales controles. En la figura 2 se muestran los niveles de MT inducida en estas poblaciones tras la exposición a cadmio.

**Tabla 4.9.** Valores medios  $\pm$  DE (n= 4-6) del contenido de cadmio ( $\mu\text{g}$  de Cd/g muestra) y del contenido de MT ( $\mu\text{g}$  de MT/g muestra), relación molar MT/Cd y relación molar MT inducida/Cd en la fracción soluble, de muestras correspondientes a animales controles y a animales expuestos durante 96 h a 0,1 mg Cd/L. nd: por debajo del límite de detección.

Población	Tratamiento	Sexo	Niveles de cadmio	Niveles MT	Relación molar MT/Cd	Relación molar MT ind/Cd
A	Control	M	nd	96,413 $\pm$ 17,64	---	---
		H	nd	341,827 $\pm$ 9,78	---	---
	Tratados	M	1,038 $\pm$ 0,097	134,267 $\pm$ 33,67	2,43	0,69
		H	2,291 $\pm$ 0,259	402,271 $\pm$ 5,67	3,07	0,50
LMT(B)	Control	M	nd	41,703 $\pm$ 10,16	---	---
		H	nd	64,729 $\pm$ 37,37	---	---
	Tratados	M	2,36 $\pm$ 0,16	87,786 $\pm$ 41,21	0,69	0,37
		H	5,38 $\pm$ 0,781	270,194 $\pm$ 81,56	0,94	0,72



**Figura 4.2.** Niveles de MT basal e inducida en las poblaciones expuestas a 0,1 mg Cd/g durante 96 h. (M: machos, H: hembras).

Como en el caso de las poblaciones expuestas a 0,5 mg Cd/L, los niveles de cadmio estuvieron por debajo del límite de detección en todos los individuos control. El análisis estadístico, mediante el test de ANOVA, de los niveles de cadmio en la fracción soluble (tabla 4.10) en las dos poblaciones bisexuales LMT(B) y A, reveló un efecto de la población y un efecto significativo del sexo (tabla 4.10).

Los test *a posteriori* revelaron que, tras la exposición, los niveles de cadmio encontrados en los machos de ambas poblaciones fueron significativamente menores que los de las hembras (tabla 4.11). Entre poblaciones, los niveles de cadmio en las hembras y machos de LMT(B) fueron significativamente mayores que los respectivos de A.

**Tabla 4.10.** Tabla de ANOVA para los valores de contenido de cadmio de la fracción soluble de muestras correspondientes a LMT(B), y A expuestos durante 96 h a 0,1 mg Cd/L.

LMT(B)-A	NIVELES DE Cd			
FUENTE	gl	Suma de cuadrados	F	P
Sexo	1	18,269	102,599	<0,0001*
Población	1	19,392	108,906	<0,0001*
Sexo x Población	1	3,122	17,535	0,0013*
Residual	12	2,137	---	---

(\*) Diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

**Tabla 4.11.** Test de Fisher ( $p \leq 0,05$ ), del nivel de cadmio en la fracción soluble tras la exposición a 0,1 mg /L de cadmio en las poblaciones LMT(B) y A.

LMT(B)-A	Dif. media	Dif. crítica	p
H Trat LMT(B)-M Trat LMT(B)	3,021	0,650	< 0,0001*
H Trat A- M trat A	1,254	0,650	0,0012*
H Trat LMT(B)- H Trat A	3,085	0,650	< 0,0001*
M Trat LMT(B)- M Trat A	1,318	0,650	0,0008*

(\*) Diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

El análisis estadístico, mediante el test de ANOVA, de los niveles de MT en la fracción soluble muestra que existe un incremento significativo de los niveles de MT tras 4 días de exposición a 0,1 mg Cd/L, con diferencias significativas entre machos y hembras en ambas poblaciones y efecto de la población. También se observa un efecto significativo de todas las interacciones que estos factores generan (tabla 4.12).

**Tabla 4.12.** Tabla de ANOVA para los valores de contenido de MT de la fracción soluble correspondiente a individuos de expuestos de LMT(B), y A durante 96 h a 0,1 mg Cd/L.

LMT(B)-A		NIVELES DE MT		
FUENTE	gl	Suma de cuadrados	F	P
Tratamiento	1	49775,048	25,5	<0,0001*
Sexo	1	238435,609	122,4	<0,0001*
Población	1	101837,310	52,3	<0,0001*
Tratamiento x sexo	1	12497,731	6,4	0,0183*
Tratamiento x población	1	21393,759	11,0	0,0029*
Población x sexo	1	46966,824	24,1	<0,0001*
Tratamiento x sexo x población	1	9062,376	4,7	0,0413*
Residual	24	46764,411	---	---

(\*) Diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

En cuanto a los niveles de MT, los tests *a posteriori* (tabla 4.13), revelaron que existe un incremento significativo en los valores de MT tras la exposición a cadmio en hembras de la población LMT(B), y que esta inducción es significativamente mayor en las hembras que en los machos. Sin embargo, no existían diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de MT de machos y hembras controles de LMT(B). En cuanto a la población argentina A, las hembras presentaron niveles de MT significativamente superiores que los de los machos, tanto en el caso de individuos control como en los individuos que habían sido expuestos a 0,1 mg Cd/L. Sin embargo, no existe una inducción significativa de MT tras la exposición a cadmio en ninguno de los dos sexos. Como podemos ver en la figura 4.2, las hembras de LMT(B) fueron las que indujeron mayor cantidad de MTs tras la exposición. A presentó los mayores niveles de MT basales y valores mayores de MT tras la exposición. No hay diferencias significativas entre los machos de ambas poblaciones ni antes ni después de la exposición a cadmio.

**Tabla 4.13.** Test de Fisher ( $p \leq 0,05$ ), de los niveles de MT en la fracción soluble de las poblaciones LMT(B) y A tras la exposición a 0,1 mg /L de cadmio durante 96 h.

LMT(B)-A	Dif. media	Dif. crítica	p
H Control LMT(B)-M Control LMT(B)	23,026	61,825	0,4496
H Control LMT(B)-H Trat LMT(B)	-205,465	61,825	< 0,0001*
M Control LMT(B)-M Trat LMT(B)	-46,083	61,825	0,1370
H Trat LMT(B)-M trat LMT(B)	182,408	61,825	< 0,0001*
H Control A-M Control A	245,413	61,825	< 0,0001*
H Control A-H Trat A	-33,308	61,825	0,2772
M Control A-M Trat A	-37,853	61,825	0,2185
H Trat A-M trat A	240,868	61,825	< 0,0001*
H Control LMT(B)-H Control A	-277,098	61,825	< 0,0001*
M Control LMT(B)-M Control A	-54,710	61,825	0,0803
H Trat LMT(B)- H Trat A	-104,941	61,825	0,0018*
M trat LMT(B)-M Trat A	-46,481	61,825	0,1338

(\*) Diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

En cuanto a los valores de relación molar MT/Cd, las hembras de A presentaron el valor mayor (3,07), seguido de 2,43 en los machos de la misma población, valores mucho mayores que los de LMT(B): 0,94 en hembras y 0,69 en machos. Sin embargo, las hembras de LMT(B) presentaron un mayor valor de relación molar MT inducida/cadmio (0,72).

#### 4.4.- DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo muestran que tanto en las poblaciones expuestas a 0,5 mg Cd/L como en las expuestas a 0,1 mg Cd/L se produjo una entrada detectable de cadmio en la fracción soluble como consecuencia de la exposición, siendo los niveles alcanzados diferentes en función de la población y el sexo. Las diferencias encontradas entre poblaciones pudiera parecer que entran en contradicción con los resultados encontrados en el capítulo anterior, en que las distintas poblaciones (con la excepción de A) mostraron un proceso de acumulación

altamente conservado en el género. Sin embargo, hay que tener en cuenta que a las 96 h de exposición a 0,5 y 0,1 mg Cd/L no se ha alcanzado el estado de equilibrio, ya que el tiempo menor requerido para alcanzar dicho estado según predecía el modelo farmacocinético utilizado, era de 291 horas.

En cuanto a las diferencias entre sexos, en todos los casos las hembras presentaban mayores niveles de cadmio que los machos, pudiendo ser ésta, en parte, al menos, la explicación de la mayor mortalidad de las hembras registrada durante las experiencias de acumulación-eliminación.

La acumulación diferencial de tóxicos en machos y hembras ha sido constatada por algunos autores en distintas especies, aunque existe cierta controversia acerca de las razones de éstas diferencias (Ray, 1984). Los factores que en este aspecto pueden ser relevantes son: el tamaño, la actividad (o metabolismo), la composición, la regulación endocrina y la actividad reproductora. Así, en algunos trabajos se ha sugerido una relación de las tasas de asimilación con el tamaño del organismo (Landrum *et al.*, 1992; Lotufo *et al.*, 2000a) lo cual podría a su vez influir en la cinética del metal. El mayor contenido de lípidos en las hembras parece ser la causa de los mayores niveles de compuestos orgánicos (DDT) respecto de los machos (Lotufo *et al.*, 2000b). Por último, se han relacionado las diferencias en acumulación de cadmio entre machos y hembras de ratas jóvenes con las diferencias en la regulación endocrina entre los dos sexos (Blazka *et al.*, 1988; Blazka y Shaikh, 1991). Se sabe que en mamíferos las hormonas esteroides sexuales pueden modificar la toxicidad del cadmio y que algunas veces lo hacen alterando la tasa de acumulación del metal (Nishiyama *et al.*, 1988; Takiguchi *et al.*, 2001).

El tamaño sería otro importante factor a considerar, teniendo en cuenta el dimorfismo sexual que manifiestan las especies estudiadas de *Artemia*. Las medidas de longitud de los individuos adultos de las distintas poblaciones fue suministrada por el Dr. Amat. Las dos poblaciones partenogenéticas mostraron tamaños mayores que las bisexuales, con valores de 9,90 mm de media para LMT(PD) y 10,70 mm para P. En las poblaciones bisexuales las hembras fueron siempre algo mayores. La longitud de SF(Br) fue de 9,10 mm para las hembras y 7,80 mm para los machos.

A fue algo más pequeña, con 8,50 mm para las hembras y 7,90 para los machos y, por último, LMT(B) fue la que presentó un tamaño menor, con valores de 7,90 mm para las hembras y 7,30 mm para los machos. A la vista de estos datos sería más lógico pensar que, atendiendo al tamaño, las hembras presentarían un menor contenido de cadmio, dado su menor relación superficie/volumen.

Nuestros resultados revelan una alta relación molar MT/cadmio en las diferentes poblaciones de *Artemia* estudiadas, en comparación con otros crustáceos (Martínez, 1996).

Los resultados de nuestros experimentos muestran que existen diferencias entre las poblaciones de *Artemia* estudiadas en cuanto al contenido de MT y que los niveles alcanzados son dependientes del sexo. En todas las poblaciones estudiadas y tras la exposición al metal, las hembras presentaban mayores niveles de MT que los machos de la población correspondiente. Estas diferencias podrían atribuirse, en principio, al mayor contenido de cadmio que se alcanza en las hembras. Sin embargo, al calcular la relación molar MT/Cd y MT inducida/Cd vemos que estas relaciones siguen siendo mayores en las hembras. Se ha descrito una mayor concentración de MT renal en las hembras de ratón en comparación con los machos (Shaikh *et al.*, 1993) y se ha atribuido al estradiol la responsabilidad de que la acumulación de cadmio sea más rápida en el hígado, así como la mayor inducción de MT en el hígado y el riñón de ratas hembra (Blazka y Shaikh, 1991). En crustáceos se han detectado hormonas esteroideas típicas de vertebrados (Fairs *et al.*, 1989), así como actividades enzimáticas que participan en el metabolismo de estas hormonas (Oberdorster *et al.*, 1998) aunque se desconoce exactamente la relevancia fisiológica de las mismas.

Otro hecho a tener en cuenta es que durante los experimentos se alcanza la madurez sexual de los individuos y, por tanto, las hembras comienzan a manifestar los procesos de ovogénesis. En mamíferos se ha establecido un importante papel de las MT en la proliferación celular (Miles *et al.*, 2000), encontrándose altos niveles de síntesis de MT en los últimos estadios de gestación (Andersen *et al.* 1983).

Las diferencias detectadas en los niveles de MT entre las poblaciones fueron más evidentes cuando se compararon los niveles alcanzados tras la exposición al cadmio. Al comparar el valor de los niveles basales entre las diferentes parejas, solamente el valor correspondiente a A resultó ser estadísticamente diferente de LMT(B).

Cabe destacar que no encontramos diferencias en los niveles basales de MT ni en los alcanzados tras la exposición al metal entre P y LMT(PD), poblaciones que, aunque pertenecen a una misma especie, presentan diferente ploidía. Las células que presentan diferente ploidía muestran características morfológicas, fisiológicas y de desarrollo muy distintas, encontrándose que, en algunos casos, los organismos poliploides tienen un mayor tamaño celular (Galitski *et al.*, 1999). También cabría esperar un aumento de la síntesis de proteínas como consecuencia de la mayor carga genética. Sin embargo, parece que aunque durante el proceso de poliploidización todo los *loci* genéticos son duplicados, durante la evolución posterior del genoma poliploide puede tener lugar la divergencia funcional de algunos genes redundantes o el silenciamiento de los mismos, de forma que el nivel de expresión alcanzado es similar a la del organismo diploide. A este último fenómeno se le denomina "diploidización" (Galitski *et al.*, 1999). Así, en el anfibio *Odontophrynus americanus*, los individuos tetraploides, aunque con un contenido doble de DNA que los diploides, mostraron niveles totales de RNA prácticamente iguales que estos últimos (Beçak y Beçak, 1998). Algo similar podría haber ocurrido durante la evolución de los genes para las MTs de P a partir de sus antecesores diploides, lo que explicaría que los niveles de MT sean muy similares en las dos poblaciones partenogénicas.

Los niveles más altos de MT fueron alcanzados por las hembras de SF (489 µg/gr tras la exposición a 0,5 mg Cd/L) y las hembras de A (402 µg/g tras la exposición a 0,1 mg Cd/L). La utilización de marcadores AFLP ha mostrado que estas dos especies presentan una considerable proximidad genética y son englobadas bajo la denominación de "especies bisexuales del Nuevo Mundo" (Sun *et al.*, 1999).

Nuestros resultados demuestran una variabilidad en el contenido de MT entre las distintas poblaciones y entre los dos sexos de las poblaciones sexuales. Sin

embargo, el hecho de haber realizado un estudio basado en los niveles totales de MT limita la interpretación de estos resultados. Hay que hacer notar la ausencia de información disponible acerca de las características de las distintas isoformas que parece que esta especie presenta (<http://www.chemistry.natsci.csulb.edu/racey.htm>). No obstante, esta variabilidad en la síntesis de MT de las distintas poblaciones podría determinar una diferente sensibilidad a la toxicidad por cadmio. Tal como se ha demostrado en numerosos estudios, principalmente en mamíferos, la MT desempeña un importante papel en la detoxificación de los metales, bien por el secuestro del metal o por la reducción de la entrada de metal en las células (Miles *et al.*, 2000).

En *Drosophila melanogaster*, el descubrimiento de la existencia de dos genes para la MT (*Mtn* y *Mto*) y la "construcción" de moscas transgénicas para estos alelos ha permitido conocer el papel de cada una de las isoformas en la protección frente a la toxicidad del cadmio. También se conoce de la aparición, en algunas cepas de *D. Melanogaster*, de amplificaciones "en tandem" de uno de esos genes como consecuencia de la presión de selección por la exposición a cobre (Otto *et al.*, 1986). Los estudios realizados con mamíferos transgénicos para los genes de las MT han resultado desconcertantes en muchos aspectos, planteando muchas incógnitas acerca del papel de las MT y del por qué de su aparición durante la evolución (Klaassen *et al.*, 1999; Palmiter, 1999). *Artemia* sería equivalente a la "drosophila" de los crustáceos por el alto conocimiento de muchos de los aspectos relacionados con su genética, fisiología, ecología, taxonomía, etc. que permiten su utilización como modelo en muchos estudios. Además, evolutivamente, puede considerarse un crustáceo primitivo del que existen varias especies y poblaciones actuales con distinto modo de reproducción y ploidía, cuya diversidad está en peligro por la introducción de *A. franciscana* en diversos habitats (Amat, comunicación personal).

Por todo lo anteriormente descrito, el estudio a nivel molecular de las bases fisiológicas que subyacen a la diversidad encontrada en el presente capítulo en el género *Artemia* podría arrojar mucha luz sobre la evolución y función de las MTs en el reino animal.

#### 4.5.- BIBLIOGRAFÍA

- Acey, R. A., Yoshida, B. N. y Edep, M. E. (1989). "Metalloproteins in developing *Artemia*." *Cell and Molecular Biology of Artemia*: 203-219.
- Andersen, R.D., Piletz, J.E., Birren, B.W. y Herschman, H.R. (1983). "Levels of metallothionein messenger RNA in foetal, neonatal and maternal rat liver". *European Journal of Biochemistry* **131**: 497-500.
- Beçak, M. L. y Beçak, W. (1998). "Evolution by polyploidy in Amphibia: new insights." *Cytogenetics and Cell Genetics* **80**(1-4): 28-33.
- Blazka, M. E., Nolan, C. V. y Shaikh, Z. A. (1988). "Developmental and sex differences in cadmium distribution and metallothionein induction and localization." *Journal of Applied Toxicology* **8**(3): 217-22.
- Blazka, M. E. y Shaikh, Z. A. (1991). "Sex differences in hepatic and renal cadmium accumulation and metallothionein induction. Role of estradiol." *Biochemistry and Pharmacology* **41**(5): 775-80.
- Cousins, R. J. (1985). "Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin." *Physiological Review* **65**(2): 238-309.
- Dalton, T. P., Lio, Q. W., Bittel, D., Liang, L. C. y Andrews, G. K. (1996). "Oxidative Stress Activates Metal Responsive Transcription Factor 1 Binding Activity: Occupancy *In Vivo* Of Metal Response Elements In the Metallothionein I Gene Promoter." *Journal Of Biological Chemistry*. Oct **271**(42): 26233-26241.
- Del Ramo, J., Martínez, M., Pastor, A., Torreblanca, A. y Diaz-Mayans, J. (1993). "Effect of Cadmium Pre-Exposure in Cadmium Accumulation by Brine Shrimp *Artemia* - Involvement of Low-Molecular-Weight Cadmium-Binding Ligands." *Marine Environmental Research* **35**(1-2): 29-33.
- Del Ramo, J., Torreblanca, A., Martínez, M., Pastor, A. y Diaz-Mayans, J. (1995). "Quantification of Cadmium-Induced Metallothionein in Crustaceans by the Silver-Saturation Method." *Marine Environmental Research* **39**: 121-125.
- Engel, D. W. y Brouwer, M. (1987). "Metal regulation and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus*: metallothionein function in metal metabolism." *Biological Bulletin* **173**: 239-251.
- Fairs, N. J., Evershed, R. P., Quinlan, P. T. y Goad, L. J. (1989). "Detection of unconjugated and conjugated steroids in the ovary, eggs, and haemolymph of the decapod crustacean *Nephrops norvegicus*." *General and Comparative Endocrinology* **74**(2): 199-208.
- Galitski, T., Saldanha, A. J., Styles, C. A., Lander, E. S. y Fink, G. R. (1999). "Ploidy regulation of gene expression." *Science* **285**(5425): 251-4.
- Hammer, D. H. (1986). "Metallothionein." *Annual Review of Biochemistry* **55**: 913-951.
- Jayasekara, S., Drown, D. B. y Sharma, R. P. (1986). "Tolerance to cadmium and cadmium-binding ligands in Great Salt Lake brine shrimp (*Artemia salina*)." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **11**: 23-30.

- Kägi, J. H. R. y Kojima, Y. (1987). Chemistry and Biochemistry of metallothionein. Metallothionein II. Kojima, Y. y Kägi, J. H. R. Basel, Birkhäuser Verlag: 25-61.
- Kägi, J. H. R. y Schäffer, A. (1988). "Biochemistry of metallothionein." *Biochemistry* **27**(23): 8509-8515.
- Klaassen, C. D., Liu, J. y Choudhuri, S. (1999). "Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **39**: 267-294.
- Kojima, Y., Binz, P. A. y Kägi, J. H. R. (1999). Nomenclature of metallothionein: Proposal for a revision. Metallothionein IV. Klaassen, C. D. Basel, Birkhäuser Verlag: 3-6.
- Landrum, P. F., Lee, H. y Lydy, M. J. (1992). "Toxicokinetics in aquatic systems: model comparisons and use in hazard assessment." *Environmental Toxicology and Chemistry* **11**: 1709-1725.
- Liu, Y., Liu, J., Iszard, M. B., Andrews, G. K., Palmiter, R. D. y Klaassen, C. D. (1995). "Transgenic mice that overexpress metallothionein-I are protected from cadmium lethality and hepatotoxicity." *Toxicological Applied Pharmacology* **135**: 222-228.
- Lotufo, G. R., Farrar, J. D. y Bridges, T. S. (2000a). "Effects of exposure source, worm density, and sex on DDT bioaccumulation and toxicity in the marine polychaete *Neanthes arenaceodentata*." *Environmental Toxicology and Chemistry* **19** (2): 472-484.
- Lotufo, G. R., Landrum, P. F., Gedeon, M. L., Tigue, E. A. y Herche, L. R. (2000b). "Comparative toxicity and toxicokinetics of DDT and its major metabolites in freshwater amphipods." *Environmental Toxicology and Chemistry* **19** (2): 368-379.
- Margoshes, M. y Vallee, B.L. (1957). "A cadmium protein from equine kidney cortex." *Journal of American Chemistry Society* **79**: 4813-4814.
- Martínez, M., Del Ramo, J., Torreblanca, A., Pastor, A. y Díaz-Mayans, J. (1991). "Presence of Cd-binding proteins in pre-exposed and not pre-exposed cadmium brine shrimp *Artemia*." *Toxicological and Environmental Chemistry* **31-32**: 417-424.
- Martinez, M. (1996). "Estudio del papel de las metalotioneínas en la fisiología de los metales en crustáceos". Departamento de Biología Animal. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. Valencia.
- Masters, B. A., Quafe, C. J., Erickson, J. C., Kelly, E. J., Froelick, G. J., Zambrowicz, B. P., Brinster, R. L. y Palmiter, R. D. (1994). "Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles." *Journal of Neuroscience* **14**: 5844-5857.
- Miles, A.T., Hawksworth, G.M., Beattie, J.H. y Rodilla, V. (2000). "Induction, regulation, degradation and biological significance of mammalian metallothioneins". *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **35**(1): 35-70.

- Nishiyama, S., Onosaka, S., Taguchi, T., Konishi, Y., Tanaka, K. y Kinebuchi, H. (1988). "Stimulation of cadmium uptake by estradiol in the kidney of male rats treated with cadmium." *Biochemistry and Pharmacology* **37**(16): 3091-6.
- Oberdorster, E., Rittschof, D. y LeBlanc, G. A. (1998). "Alteration of [14C]-testosterone metabolism after chronic exposure of *Daphnia magna* to tributyltin." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **34**(1): 21-5.
- Otto, E., Young, J. E. y Maroni, G. (1986). "Structure and expression of a tandem duplication of the *Drosophila* metallothionein gene." *Proceedings of National Academy of Science USA* **83**(16): 6025-9.
- Otvos, J. D., Olafson, R. W. y Armitage, I. M. (1982). "Structure of an invertebrate metallothionein from *Scylla serrata*." *Journal Of Biological Chemistry* **257**: 2427-2431.
- Palmiter, R. D. (1994). "Regulation of Metallothionein Genes by Heavy Metals Appears to Be Mediated by a Zinc-Sensitive Inhibitor That Interacts with a Constitutively Active Transcription Factor, MTF-1." *Proceedings of National Academy of Science USA* **91**(4): 1219-1223.
- Palmiter, R. D. (1999). Metallothionein facts and frustrations. Metallothionein IV. Klaassen, C. D. Basel, Birkhäuser Verlag: 215-221.
- Ray, S. (1984). "Bioaccumulation of cadmium in marine organisms." *Experientia* **40**(1): 14-23.
- Roesijadi, G. (1992). "Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals." *Aquatic Toxicology* **22**: 81-114.
- Scheuhammer, A. M. y Cherian, M. G. (1986). "Quantification of Metallothioneins by a Silver-Saturation Method." *Toxicology and Applied Pharmacology* **82**: 417-425.
- Shaikh, Z. A., Jordan, S. A. y Tewari, P. C. (1993). "Cadmium disposition and metallothionein induction in mice: strain-, sex-, age- and dose-dependent differences." *Toxicology* **80**(1): 51-70.
- Sun, Y., Song, W., Zhong, Y., Zhang, R., Abatzopoulos, T. J. y Chen, R. (1999). "Diversity and genetic differentiation in *Artemia* species and populations detected by AFLP markers." *International Journal of Salt Lake Research* **8**: 341-350.
- Takiguchi, M., Cherrington, N. J., Hartley, D. P., Klaassen, C. D. y Waalkes, M. P. (2001). "Cyproterone acetate induces a cellular tolerance to cadmium in rat liver epithelial cells involving reduced cadmium accumulation." *Toxicology* **165**(1): 13-25.
- Varó, I., Amat, F., Sarabia, R. y Diaz-Mayans, J. (1998). Effect of chronic exposure to cadmium in sexual and asexual of brine shrimp *Artemia*. 8th Annual Meeting of SETAC-Europe. Interfaces in environmental chemistry and toxicology: from the global to the molecular level, Bordeaux, France.

# 5

## DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

### 5.1.- DISCUSIÓN GENERAL.

Para la consecución del objetivo planteado en el capítulo de toxicidad ha sido decisiva la utilización de Modelos Lineales Generalizados de regresión logística en la comparación de las curvas de mortalidad de los nauplios de las distintas poblaciones ante la exposición aguda a cadmio. De esta forma, se han podido alcanzar los objetivos previstos puesto que, a través de los parámetros que definen cada curva, se ha podido cuantificar la sensibilidad al tóxico y la uniformidad de respuesta de cada población, así como determinar la significación estadística de las diferencias entre poblaciones. Esto ha permitido conocer la influencia de factores genéticos (especie, nivel de ploidía), ambientales (población) así como el modo de reproducción (partenogénesis o sexualidad) en la sensibilidad al cadmio. Destaca en este apartado la alta tolerancia encontrada en los nauplios de *A. persimilis* (A) y de *A. parthenogenetica* (de la laguna de Petróla) (P) y que contrasta con la sensibilidad de las dos poblaciones de *A. franciscana* (SF y SF(Br)). Los resultados obtenidos en las poblaciones de *Artemia* estudiadas, pertenecientes a 4 de las 9 especies descritas, parecen indicar una elevada tolerancia de los nauplios de este género ante la toxicidad del cadmio.

La utilización de un modelo bicompartimental con cinética de primer orden ha permitido evaluar y comparar la acumulación y eliminación de cadmio en las distintas poblaciones de *Artemia* estudiadas. Aunque el modelo utilizado es muy simple, en comparación con la complejidad de los procesos implicados en la acumulación de cadmio, se han conseguido ajustes relativamente buenos que permiten predecir los niveles de metal en los organismos una vez alcanzada la fase

de equilibrio. Se ha encontrado un comportamiento cadmio-regulador en *Artemia* y una eliminación relativamente rápida del metal que contrasta con el calificativo de acumulador neto propuesto para este género (Rainbow, 1998) (capítulo 3). El patrón de acumulación de cadmio parece estar muy conservado en el género, siendo *A. persimilis* (A) la única población que presenta un modelo diferente a las demás. Dicho modelo se caracteriza por una menor constante de acumulación que explica el menor BCF respecto a las demás poblaciones expuestas a la misma concentración de cadmio.

Al estudiar las diferencias entre las poblaciones en cuanto a los niveles de MT, se ha encontrado que las hembras de *A. persimilis* (A) presentaban mayor nivel de MT basal que el resto de poblaciones y que, junto a las hembras de SF, alcanzaron los mayores contenidos de MT tras la exposición al metal. Las hembras de la población de *A. salina* (LMT (B)) fueron las que presentaron una mayor relación molar MT inducida/Cd. La influencia del sexo es bastante coherente en todas las poblaciones estudiadas, siendo las hembras las que mayores contenidos de cadmio y niveles de MT alcanzan tras el tratamiento con el metal.

Nuestros resultados plantean más incógnitas nuevas de las que resuelven. ¿Por qué los machos y las hembras de casi todas las poblaciones estudiadas presentan un distinto comportamiento frente a la acumulación del cadmio y la síntesis de MT? ¿Por qué es distinta *A. persimilis* (A) del resto de poblaciones en todos los aspectos relativos a la toxicidad y acumulación de cadmio que hemos estudiado? Es difícil conocer hasta qué punto ha podido influir en la sensibilidad y en los mecanismos de acumulación de cadmio el habitat particular al que está adaptada la población *A. persimilis* (A) o su aneuploidía respecto del resto de poblaciones diploides.

En resumen, las poblaciones de *Artemia* estudiadas han mostrado variabilidad fenotípica inter e intraespecífica para todos los aspectos estudiados. Estos resultados dan idea de la importancia del mantenimiento de la biodiversidad dentro del género, ya que asegura un mayor rango en las respuestas ante un posible agente estresante, como es el cadmio. En este sentido, coincidimos con Hairston (1996) (capítulo 2) en considerar los bancos de quistes como un importante

reservorio ecológico, potencialmente utilizable en caso de un cambio medioambiental.

## **5.2.- CONCLUSIONES.**

A continuación, se enumeran las principales conclusiones que se extraen del presente trabajo:

**1.-** Los Modelos Lineales Generalizados permiten comparar las curvas de mortalidad de los nauplios pertenecientes a las distintas poblaciones y cuantificar las diferencias de sensibilidad y la uniformidad de la respuesta.

**2.-** Los nauplios de las distintas poblaciones de *Artemia* presentan diferente sensibilidad ante la toxicidad aguda del cadmio, siendo las poblaciones de *A. franciscana* las más sensibles, y *A. parthenogenetica* (de la laguna de Petróla) (P) y *A. persimilis* (A) las más tolerantes.

**3.-** La variabilidad intrapoblacional en la respuesta letal al cadmio de los nauplios de *A. franciscana* procedente de Brasil, SF(Br), y *A. persimilis* (A) es diferente a la del resto de poblaciones estudiadas. SF(Br) muestra la respuesta más uniforme mientras que, en el otro extremo, A presenta la mayor variabilidad.

**4.-** El modelo toxicocinético bicompartimental con cinética de primer orden, utilizado para describir la acumulación de cadmio en individuos adultos de *Artemia*, se ajusta razonablemente bien a los datos experimentales, pudiendo describir y comparar la cinética de acumulación del cadmio en las distintas poblaciones.

**5.-** El proceso de acumulación parece estar bien conservado en el género, a excepción de *A. persimilis* (A), que muestra un modelo diferente caracterizado por un menor BCF que el resto de poblaciones.

**6.-** *Artemia*, en conjunto, muestra un comportamiento regulador para el cadmio dentro del rango de 0,1 a 1 mg Cd/L, mostrando contenidos de cadmio similares en el estado de equilibrio.

**7.-** Los niveles de cadmio alcanzados en la fracción soluble tras la exposición de los individuos adultos al cadmio, son dependientes de la población y del sexo, mostrando las hembras niveles superiores a los machos.

**8.-** Los niveles de MT de los individuos mostraron dependencia de la exposición a cadmio, del sexo y de la población.

**9.-** La existencia de diferencias fenotípicas inter e intraespecíficas demostradas en el presente trabajo avala el interés de los estudios sobre diversidad fisiológica y plantea la necesidad de desarrollar este tipo de estudios útiles en la caracterización de las especies.

**10.-** El tipo de respuestas particulares de *A. persimilis* (A) en lo que se refiere a la toxicidad, acumulación y niveles de metalotioneínas (MT), por una parte, y la influencia del sexo en este tipo de respuestas en las poblaciones estudiadas, por otra, son puntos de interés prioritario para futuras investigaciones.

## ABREVIATURAS

□	Tasa de asimilación
A	Población de <i>Artemia persimilis</i> procedente de Salinas Grandes de Hidalgo (Argentina).
At	Población de <i>Artemia salina</i> procedente de la Laguna de Megrine (Túnez)
BCF	Factor de bioconcentración
Cae	Concentración de metal en el animal en el estado de equilibrio
CL <sub>50</sub>	Concentración correspondiente a una mortalidad del 50% de los individuos
CL <sub>10</sub>	Concentración correspondiente a una mortalidad del 10% de los individuos
CL <sub>70</sub>	Concentración correspondiente a una mortalidad del 70% de los individuos
CR	Tasa de aclaramiento
Cw	Concentración de metal en el medio de exposición
D	Población de <i>Artemia parthenogenetica</i> procedente de Delta del Ebro (Península Ibérica)
GLiM	Modelos Lineales Generalizados

I	Tasa de entrada de metal
Ka	Constante de acumulación
Ke	Constante de eliminación
LMT(B)	Población de <i>Artemia salina</i> procedente de la Laguna de La Mata (Península Ibérica)
LMT(PD)	Población de <i>Artemia parthenogenetica</i> procedente de la Laguna de La Mata (Península Ibérica)
LOEC	Menor concentración que muestra un efecto significativo
MT	Metalotioneína
P	Población de <i>Artemia parthenogenetica</i> procedente de la laguna de Pétrola (Península Ibérica)
SF	Población de <i>Artemia franciscana</i> procedente de la Bahía de San Francisco (USA)
SF(Br)	Población de <i>Artemia franciscana</i> procedente de Macau (Brasil)
$t_{50}$ ó $t_{1/2}$	Tiempo de vida media del metal en el organismo