

Uso de la metabolómica ecológica como herramienta complementaria para el estudio de la salud integral de los ecosistemas

Uso da metabolómica ecológica como ferramenta complementar para o estudo da saúde integral dos ecossistemas

Use of ecological metabolomics as a complementary tool for the study of the integral health of ecosystems

Antonio de Jesús Lara-Del Río, Rogelio Flores-Ramírez, Fernando Díaz-Barriga, Erika García-Chavez, Guillermo Espinosa Reyes

Centro de Investigación Aplicada en Ciencia y Tecnología-Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Avenida Sierra Leona N° 550, CP 78210, Colonia Lomas Segunda Sección, San Luis Potosí, SLP, México.

Cita: Lara-Del Río AJ, Flores-Ramírez R, Díaz-Barriga Martínez F, García-Chávez E, Espinosa Reyes G. Uso de la metabolómica ecológica como herramienta complementaria para el estudio de la salud integral de los ecosistemas. Rev. salud ambient. 2020; 20(1):3-13.

Recibido: 24 de julio de 2019. **Aceptado:** 5 de marzo de 2020. **Publicado:** 15 de junio de 2020.

Autor para correspondencia: Guillermo Espinosa Reyes.

Correo e: espinosareyes@gmail.com

Centro de Investigación Aplicada en Ciencia y Tecnología-Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Avenida Sierra Leona N° 550, CP 78210, Colonia Lomas Segunda Sección, San Luis Potosí, SLP, México.

Financiación: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto SEMARNAT-CONACYT 2017-2018 con número A3-S-78964 y FSSEP02-C-2018-1 con número A1-S-27598.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses que hayan influido en la realización y la preparación de este trabajo.

Declaraciones de autoría: Todos los autores contribuyeron al diseño del estudio y la redacción del artículo. Asimismo todos los autores aprobaron la versión final.

Resumen

Los ecosistemas del planeta presentan síntomas que nos advierten claramente que los procesos de resiliencia ya no son tan eficientes; están en declive, como consecuencia de diversas actividades humanas que alteran sus componentes físicos, químicos, biológicos y sus interrelaciones. Por lo tanto, este rápido deterioro requiere de una monitorización ambiental más adecuada, intensificando la necesidad de indicadores que sean más operativos. Una de las limitantes que se presenta al momento de monitorear un ecosistema es que no se cuenta con herramientas que evidencien y detecten tempranamente cambios potencialmente dañinos en las capacidades funcionales del mismo. Sin embargo, el enfoque holístico de las llamadas ciencias ómicas (genómica, transcriptómica, metabolómica), en especial metabolómica, podría ser una importante herramienta que permita generar datos para acceder a la metacognición del concepto de vulnerabilidad ecológica y su importancia al momento de monitorear un ecosistema. La base de la metabolómica es el monitoreo de la variabilidad fenotípica en respuesta a los cambios ambientales (interacciones bióticas y abióticas), proporcionando un mejor análisis de las diferentes capacidades de respuesta conferidas por la plasticidad fenotípica de cada especie, permitiendo así, determinar el metabolismo que está involucrado en esta plasticidad. Las respuestas metabólicas de las especies son determinantes al momento de monitorear un ecosistema. Esta aproximación tiene un gran potencial para establecer no solo datos individuales de un organismo, sino redes de datos del comportamiento metabólico de poblaciones, o ecosistemas de manera espacial y temporal convirtiéndola en una herramienta muy interesante para monitorear un ecosistema.

Palabras clave: salud integral de los ecosistemas; vulnerabilidad; metabolómica ecológica.

Resumo

Os ecossistemas do planeta apresentam sintomas que nos alertam claramente para a falta de eficiência dos processos de resiliência; estão em declínio, em consequência das diversas atividades humanas, que alteram os seus componentes físicos, químicos, biológicos e as suas inter-relações. Portanto, a rápida degradação requer um acompanhamento ambiental adequado, intensificando a necessidade de indicadores que sejam mais operacionais. Uma das limitações que surge na monitorização de um ecossistema, é o facto das ferramentas de medição não anteciparem as alterações potencialmente nocivas às capacidades funcionais do mesmo. Porém, o enfoque holístico das chamadas ciências Ómicas (Genómica, Transcritómica, Metabolómica), em especial a metabómica, pode constituir uma ferramenta importante, que permita gerar dados para aceder à metacognição do conceito de vulnerabilidade ecológica e a sua importância, no momento de monitorar um ecossistema. A base da metabómica é o acompanhamento da variabilidade fenotípica, em resposta às alterações ambientais (interações bióticas e abióticas) proporcionando uma melhor análise das diferentes capacidades de resposta, conferida pela plasticidade fenotípica de cada espécie, permitindo assim, determinar o metabolismo que está envolvido na plasticidade. As respostas metabólicas das espécies são determinantes no momento de monitorar um ecossistema. Esta abordagem tem o grande potencial de estabelecer, não apenas dados individuais de um organismo, mas redes de dados do comportamento metabólico de populações ou ecossistemas de maneira espacial e temporal, tornando-a uma ferramenta altamente sugestiva para monitorar um ecossistema.

Palavras-chave: saúde do ecossistema; vulnerabilidade; metabolómica ecológica.

Abstract

The planet's ecosystems show symptoms that clearly warn us that resilience processes are no longer as efficient; they are in decline as a result of various human activities that alter their physical, chemical and biological components and their interrelationships. Therefore, this rapid deterioration calls for more appropriate environmental monitoring, increasingly intensifying the need for indicators that are more operational in nature. One of the limitations that arise when monitoring an ecosystem is that there are no tools for detecting and revealing potentially harmful changes in its functional capabilities early on. However, the holistic approach of the so-called omics sciences (genomics, transcriptomics, metabolomics), especially metabolomics, could be an important tool for generating data to access the metacognition of the concept of ecological vulnerability and its importance in monitoring an ecosystem. The basis of metabolomics is the monitoring of phenotypic variability in response to environmental changes (biotic and abiotic interactions), which permits a better analysis of the different response capabilities provided by the phenotypic plasticity of each species, thus allowing the metabolic pathway that is associated with this plasticity, to be determined. The metabolic responses of species are essential to monitoring ecosystems. This approach shows great potential for obtaining not only individual data on organisms but also networks of data on the metabolic behavior of populations or ecosystems in a spatial and temporal manner, which makes it a very interesting tool for monitoring ecosystems.

Keywords: ecosystem health; vulnerability; ecological metabolomics.

INTRODUCCIÓN

1. SALUD Y VULNERABILIDAD DE LOS ECOSISTEMAS

El ecosistema es una combinación de los componentes físicos y biológicos de un entorno, en el cual los organismos forman conjuntos complejos de relaciones y funcionan como una unidad en su interacción con el medio ambiente físico¹. Por lo tanto, un ecosistema saludable se considera como aquel sistema que se encuentra intacto en sus componentes físicos, químicos, biológicos y sus interrelaciones; de manera que es resistente a soportar cambios y factores estresantes. No experimenta el crecimiento o declive anormal de las especies nativas, la concentración de contaminantes o los cambios antropogénicos drásticos en su paisaje o procesos ecológicos².

La estructura y el funcionamiento de los ecosistemas del mundo han cambiado más rápidamente en la segunda mitad del siglo pasado que en ningún otro período de la historia de la humanidad. Los cambios de uso de suelo debido a la expansión de las actividades agrícolas y ganaderas, el crecimiento de las ciudades, un alto consumo de recursos naturales y el irracional uso de sustancias químicas pueden amenazar la salud de las poblaciones de vida silvestre. Estas amenazas, aumentan la vulnerabilidad de los ecosistemas; como consecuencia, se dificulta la sobrevivencia de las especies, debido a que no pueden cubrir sus necesidades básicas como alimentarse, crecer, reproducirse y ahora adaptarse a estos ambientes adversos³.

La conceptualización de un ecosistema se da en función a la prestación de los servicios que sostienen y satisfacen varias demandas de la vida humana, es decir, centra su descripción y estudio en factores

antropocéntricos⁴. Por lo tanto, cuando se hace un análisis de vulnerabilidad, los enfoques anteriores tienen gran peso. Los procedimientos actuales de evaluación de vulnerabilidad son concebidos en las ciencias biofísicas y de la vida. Habitualmente, se aplica un modelo similar al diagnóstico médico en humanos para desarrollar las evaluaciones ecológicas y monitoreando características específicas de los ecosistemas⁵. Se sigue un estilo de evaluación utilizando el modelo de presión-estado-respuesta para describir la situación del medio ambiente. Sin embargo, no siempre representa adecuadamente la salud de un ecosistema.

La salud integral de los ecosistemas no puede definirse con enfoques antropocéntricos, es un concepto de gestión holística. Por lo tanto, debe abordar la complejidad de los sistemas humanos, ambientales, y los diversos problemas de contaminación de la actualidad, que ponen en peligro la oferta de servicios ecosistémicos, el bienestar humano y la biodiversidad misma⁵.

Existe una amplia gama de indicadores de salud integral de los ecosistemas a distintos niveles de organización biológica. Ejemplo de estos indicadores son: la abundancia de especies seleccionadas, la concentración de elementos tóxicos, las proporciones entre diferentes clases de organismos, estrategias o procesos ecológicos, y la composición y estructura de los ecosistemas, entre otros⁵.

Dependiendo de las preguntas del problema ambiental a investigar, dichos conjuntos de indicadores pueden combinarse y usarse para complementarse mutuamente a fin de llevar a cabo evaluaciones integrales de la salud del ecosistema, ya que los problemas ambientales a menudo están diversificados. Por lo tanto, los indicadores aplicables a todos los diferentes tipos de preguntas de investigación y gestión no se han desarrollado hasta el momento. Los indicadores presentados, son ejemplos de la amplia gama de posibles enfoques desarrollados hasta ahora, que también refleja las definiciones y los puntos de vista versátiles de la salud del ecosistema³. Otro punto crítico, es la disponibilidad de datos para la cuantificación de los indicadores respectivos en escalas espaciales y temporales adecuadas⁴.

Cada ecosistema contiene diversas comunidades de especies que viven en un biotopo específico (caracterizado por sus propios efectos físicos, químicos, climáticos, características geográficas y morfológicas), por ende, la evaluación de la vulnerabilidad debe comprender tanto la comunidad y los aspectos del hábitat. Si un factor estresante puede inducir cambios relevantes en el hábitat, entonces esto podría resultar en una directa o indirecta perturbación de la comunidad biológica.

La vulnerabilidad del ecosistema es un concepto subdesarrollado en la evaluación del riesgo ecotoxicológico, debido a que la mayoría de los procedimientos requeridos por normativas internacionales solo están considerando el riesgo ecológico de los ecosistemas. Dicho procedimiento permite evaluar riesgos considerando diferentes escenarios ambientales. Sin embargo, muchas características importantes del ecosistema no son estimadas³. Por ejemplo, podemos examinar una normativa nueva para productos químicos donde se consideran la seguridad y los escenarios de exposición, así como las medidas de gestión que garanticen que los riesgos derivados del uso de la sustancia están adecuadamente controlada. No obstante, cuando se evalúa el riesgo ambiental, este se basa en la comparación entre una concentración prevista con efecto observado (PEC por sus siglas en inglés) y una concentración prevista sin efecto observado (PNEC por sus siglas en inglés), en el cual, este último es obtenido de pruebas de toxicidad de laboratorio. Sin embargo, este proceso se ve limitado al momento de extrapolar las pruebas estándar de laboratorio a condiciones de campo, debido a que, en muchos de los casos, no existe información para las especies representativas específicas del sitio, ni para las interacciones relacionadas con la estructura y el funcionamiento del ecosistema (efectos indirectos, capacidad homeostática, mecanismos de recuperación, etc.). Por lo tanto, en los procedimientos estándar de evaluación de riesgos, las características de la comunidad de los ecosistemas actuales son poco consideradas; y cabe resaltar, que éstas representan la vulnerabilidad de las diferentes jerarquías biológicas (población, comunidad, ecosistema, paisaje) ante diferentes situaciones de riesgo.

Actualmente, la evaluación de riesgo ecológico se logra a través de herramientas confiables y específicas que permiten comprender mejor la problemática de contaminación de los ecosistemas. La metodología se realiza a través de una serie de instrumentos centrados en el uso de biomarcadores, bioindicadores y ensayos toxicológicos. Además, se consideran indicadores como evaluación de la sensibilidad, susceptibilidad a la exposición, sensibilidad para un estresor en particular, potencial de recuperación a nivel de población y comunidad y evaluación de la capacidad de recuperación. En este último eslabón, se posicionan, como herramientas auxiliares en el análisis de vulnerabilidad ecológica -las ciencias ómicas- (herramientas basadas en genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica) las cuales facilitan el monitoreo de la variabilidad fenotípica en respuesta a los cambios ambientales como: la sequía, disponibilidad de nutrientes, contaminantes, salinidad, temperatura e interacciones bióticas entre muchos más factores ecológicos. Por lo tanto, las ciencias ómicas proporcionan un mejor análisis de las diferentes capacidades de respuesta conferidas por la

plasticidad fenotípica de cada especie, permitiendo, determinar el metabolismo que está involucrado en una respuesta, entendiendo, que las respuestas metabólicas de las especies son más concluyentes al momento de evaluar vulnerabilidad. Esta aproximación tiene un gran potencial para establecer no solo datos individuales de un organismo, sino redes de datos del comportamiento metabólico de poblaciones. Además de considerar a los ecosistemas desde perspectivas geográficas y temporales, convirtiéndola en un herramienta muy sugerente para evidenciar vulnerabilidad ecológica⁶⁻⁸.

METABOLÓMICA Y SUS APLICACIONES EN PROBLEMAS ECOLÓGICOS

El metabolismo es definido como la suma de todas las transformaciones químicas que se producen en una célula, y se manifiestan, a nivel de un organismo, mediadas por una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente que constituyen las rutas metabólicas^{9,10}. Estas reacciones permiten a los organismos crecer, reproducirse, moverse, mantenerse, repararse y responder a estímulos. El sistema de reacciones químicas se encuentra interrelacionado, representando un nivel de vital importancia para la vida¹⁰. Por lo tanto, los metabolitos tienen gran importancia en el fenotipo de un organismo: variaciones significativas en las concentraciones de éstos pueden implicar la presencia de enfermedades¹¹.

A pesar de estar la ecología aún al principio del desarrollo de técnicas basadas en la genómica y en la transcriptómica, se le presenta un nuevo reto: adaptar los recientes avances en las técnicas metabolómicas a sus estudios. Las nuevas técnicas de instrumentación analítica y bioestadística, han permitido aumentar la sensibilidad analítica y cuantificar a la vez cientos de diferentes compuestos en concentraciones dentro del rango de las que presentan la mayor parte de metabolitos en el medio celular. Así, se abre la posibilidad de estudiar la respuesta fenotípica global de un organismo, o incluso, de un ecosistema ante los cambios ambientales o de las interacciones entre diferentes organismos y especies en el medio natural. La metabolómica ecológica plantea estudiar cambios de compuestos químicos de bajo peso molecular en sistemas biológicos, ante cambios ecológicos más complejos de los estudiados hasta ahora. Por ejemplo, el estudio de las respuestas de las cadenas tróficas (planta-herbívoro-carnívoro o planta-huésped-depredador) sobre los cambios ambientales a lo largo del tiempo. El cambio de la fisiología de las plantas ante gradientes ambientales, la sinergia espacio-temporal de las respuestas de los individuos, poblaciones y ecosistemas consecuencia de las perturbaciones tales como cambio climático, y acontecimientos evolutivos en el contexto de las comunidades de plantas y animales^{7,9,12-14}.

Existen dos tipos de enfoque de un estudio metabolómico, el primero es conocido como método llamado huella digital (*fingerprinting*), basado en el análisis conjunto de metabolitos generados para cada individuo, donde cada uno de estos perfiles metabolómicos se considera como una huella digital en función a uno o varios agentes estresores¹⁵. El análisis multivariante del conjunto de estos espectros permite establecer relaciones de diferencia y similitud entre los individuos que se están analizando. El segundo método se conoce como perfilado (*profiling*) el cual consiste en el análisis multivariante de aquellos metabolitos que *a priori* se sabe que intervienen en el fenómeno que se desea estudiar¹⁵.

Aunque estas técnicas se han desarrollado sobre todo dentro del marco de los estudios biomédicos, actualmente la posibilidad del uso en el ámbito de la ecología está teniendo relevancia, debido a su doble naturaleza holística que permite caracterizar las interacciones de los organismos con su entorno (organismo-ambiente), evaluando al mismo tiempo, la función y la salud del organismo a nivel molecular^{6,14}. Los organismos en los ecosistemas están expuestos a mezclas de estresores, algunos propios del sistema y otros antrópicos, todos con interacciones difíciles de estudiar, por lo que requieren de un enfoque sistemático como la metabolómica para asegurar su comprensión específica^{14,16}. La metabolómica puede monitorear los metabolitos que se ven afectados por diversos estresores, siendo una herramienta de gran interés en procesos ecológicos naturales y en fenómenos de contaminación, al proporcionar un mejor análisis de las diferentes capacidades de respuesta conferidas por la plasticidad fenotípica de cada especie, permitiendo determinar cuáles vías metabólicas están involucradas en esta respuesta^{14,16}.

ESTUDIOS METABOLÓMICOS EN EL AMBIENTE Y USO DE LAS REDES METABÓLICAS

En los últimos años el número de estudios de metabolómica en el ambiente ha ido en aumento e incluye la aplicación de metabolómica a áreas como la ecofisiología y la ecotoxicología¹⁷⁻¹⁹. La primera con un enfoque en la comprensión de las respuestas bioquímicas que sustentan los organismos a estresores abióticos y bióticos en su entorno (luz, temperatura, falta de nutrientes, desecación y salinidad entre otros)⁶. La segunda, como una herramienta de evaluación de riesgo ecológico que típicamente involucra pruebas de toxicidad química dentro de un ambiente de laboratorio controlado, el cual, permite detectar riesgos potenciales por exposición a químicos en determinados organismos de los ambientes afectados⁶. Bajo este argumento, la metabolómica ecológica representa un enfoque emergente para examinar huellas metabólicas, o perfiles, en sistemas biológicos sometidos a estrés ambiental²⁰

y analiza el efecto bioquímico de los estresores y xenobióticos sobre la salud de las diversas especies. El enfoque considera los cambios en las concentraciones de metabolitos, que son los precursores y productos de actividad enzimática. Asocia todo lo anterior a cambios con la función biológica y/o la regulación de las redes metabólicas²⁰. En el contexto de vulnerabilidad de un ecosistema, el concepto de redes metabólicas es de suma importancia ya que evidencia el estado de salud de los organismos que conforman un ecosistema: si alguno de estos componentes se ve modificado, sería condicionante para la supervivencia de un individuo. La alteración de estos procesos se conoce como resultado final adverso observado en las rutas metabólicas ("*adverse outcome pathways*" AOP)²¹. Los AOP relacionan una serie de elementos clave ocurridos a lo largo de las rutas metabólicas, desde la interacción química inicial, hasta la presencia del resultado final adverso. El objetivo del análisis de un AOP es proporcionar los mecanismos por los que los efectos de los tóxicos actúan sobre cada nivel de organización biológica (genoma, transcriptoma, proteoma, y metaboloma)²¹. En este sentido, la metabolómica ecológica tiene un papel clave en la AOP, proporcionando información sobre los efectos y composición del metabolito, como consecuencia de la exposición de los organismos a sustancias tóxicas específicas. Lo anterior, se traduce en la identificación de grupos de biomarcadores que permiten la evaluación de riesgos de productos químicos. Por lo tanto es posible, comprender mejor los mecanismos subyacentes de acción de los compuestos tóxicos sobre componentes clave de los ecosistemas²¹.

APLICACIÓN DE LA METABÓLICA AMBIENTAL COMO SISTEMA DE MONITOREO DE PROCESOS DE CONTAMINACIÓN EN LOS ECOSISTEMAS

Actualmente, se ha consolidado un especial interés por el uso de biomarcadores (parámetros biológicos medidos en los organismos bioindicadores) que evidencian la exposición a contaminantes, efectos biológicos o riesgos de su presencia en los ecosistemas al modificarse sus niveles basales. El análisis de biomarcadores convencionales es un instrumento clave para detectar el impacto de la contaminación sobre la salud de los ecosistemas, aunque, una de las limitaciones que presenta es que requiere un profundo conocimiento sobre los mecanismos toxicológicos que siguen los contaminantes.

Estos biomarcadores se pueden utilizar en distintas especies de biota, tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres. Generalmente, un ecosistema acuático es altamente vulnerable por su tendencia a acumular concentraciones altas de contaminantes provenientes de los ecosistemas terrestres; por consiguiente, es en esta zona de transición donde el estudio de los fenómenos

de contaminación es crítico. Por esta razón, en las últimas décadas se han planteado grandes preocupaciones en todo el mundo sobre la calidad de los ambientes y el futuro de las especies de fauna de estos hábitats.

Los ecosistemas acuáticos, tienen propiedades de resistencia al cambio y un cierto grado de resiliencia que tiende a volverlos al estado original luego de experimentar cambios moderados. Sin embargo, una vez alterados más allá del límite que puede ser manejado por esas dos propiedades, los entornos acuáticos no necesariamente regresarán a su estado inicial. Especialmente porque la estabilidad temporal de los ecosistemas acuáticos puede depender de un balance específico entre muchos factores que confluyen muy estrechamente en su existencia. Los primeros estudios metabolómicos en ecosistemas, fueron dirigidos sobre especies acuáticas, evidenciando rápidamente la importancia de esta metodología en la evaluación del estado de salud y la presencia de enfermedades de un organismo, mediante el monitoreo de nuevos perfiles de biomarcadores capaces de distinguir sujetos sanos de individuos enfermos, utilizando huellas metabólicas y descripción de redes AOP²². A la fecha, la información sigue creciendo junto a la diversificación de los estudios, de tal forma que, actualmente, se pueden encontrar estudios sobre diversas líneas de investigación metabolómica tales como estrés oxidativo en peces, algas y anfibios²³⁻²⁷, estrés biológico en diversos tipos de algas²⁸⁻³⁰, efectos de temperatura en peces²², embriogénesis de peces²², mecanismos moleculares en algas³¹, metaboloma de comunidades bacterianas en ecosistemas acuáticos³², huellas metabólicas en plantas acuáticas³³, toxicidad por antibióticos y antimicóticos en peces³⁶, impacto de los microplásticos en ambientes marinos³⁷, metabolómica en la perturbación endocrina en peces^{38,39}, entre otros. La metabolómica ecológica se encuentra al principio del desarrollo e implementación de estas técnicas en los diversos escenarios ambientales, y muestra ser una herramienta prometedora para realizar monitoreo de estos escenarios.

NUEVOS SISTEMAS DE BIOMONITOREO NO INVASIVOS: CASO DE ESTUDIO METABÓLICA AMBIENTAL EN ANFIBIOS

Las poblaciones de anfibios están disminuyendo rápidamente, géneros, especies e incluso familias están en vías de extinción a tasas sin precedentes⁴⁰⁻⁴². La disminución de las poblaciones de anfibios, junto a la incidencia de deformidades a nivel mundial obedece sugerentemente a una asociación directa con diversos contaminantes presentes en sus ecosistemas^{43,44}. Estas observaciones han alarmado a la comunidad científica y al público en general, debido, a que los anfibios cumplen una función muy importante en la red trófica. Tienen

la capacidad de ser depredadores y presas. Consumen insectos y otros invertebrados, cuyas poblaciones, de no ser controladas, pueden convertirse en plagas muy problemáticas. Varios estudios han demostrado que los anfibios son organismos sensibles y adecuados para la evaluación de la genotoxicidad de los contaminantes en los ecosistemas^{45,46}, la piel semipermeable y su dependencia a los hábitats acuáticos terrestres los convierten en organismos susceptibles a los contaminantes⁴⁷.

En la última década los estudios que evidencian el impacto de los contaminantes sobre los anfibios se ha ido consolidando, analizando diversas aristas del problema y describiendo afecciones como perturbaciones endocrinas, alteraciones en la transmisión de impulsos, depredación, toxicidad entre otras^{43,48-51}. Sin embargo, los métodos de escrutinio en ocasiones no alcanzan un impacto significativo al no poder evaluar magnitudes de los efectos y no poder comparar las respuestas entre grupos. Entre los anfibios existe esta disyuntiva, la evaluación de los procesos de contaminación se ha centrado en la identificación de biomarcadores a través de técnicas bioquímicas y moleculares dirigidas, específicamente, a etapas embrionarias larvarias y en renacuajos, encontrando sobre esto problemáticas importantes, sobre todo, al considerar el ciclo de vida completo del individuo, requiriendo de biomarcadores más sensibles y representativos a cada estadio de vida. Por otra parte, se cuenta con la limitación que la mayoría de estas técnicas requieren: el sacrificio del organismo⁵²⁻⁵⁷. Sobre estos últimos argumentos, los estudios metabolómicos en anfibios han demostrado ser una herramienta importante para la expansión del conocimiento sobre esta línea, al poder generar huellas bioquímicas específicas comparables a diferentes estadios⁵⁸⁻⁶⁰. Además los estudios de este tipo permiten abrir el panorama a nuevos sistemas de valoración de técnicas no destructivas⁶¹, lo que la convierte en una técnica ampliamente utilizable en determinaciones ecológicas. La piel de los anfibios tiene numerosas glándulas, cuyas secreciones ayudan a protegerla manteniéndola húmeda cuando se encuentran fuera del agua. La secreción cutánea de los anuros está compuesta por varias moléculas químicas que pueden ser alcaloides, amins biogénicas, esteroides y péptidos. Sustancias, que forman parte del mecanismo de defensa de diversas especies, utilizadas, para contrarrestar depredadores y enfermedades producidas por parásitos y patógenos (helmintos, protozoarios, anélidos, artrópodos, virus, bacterias y hongos)⁶². Este tipo de respuestas pueden ser caracterizadas por técnicas ómicas no destructivas evidenciando el mecanismo metabólico implícito en alguna red AOP del anfibio^{61,63} que, de ser alterada, representa vulnerabilidad.

DESAFÍOS

Muchos objetivos importantes en el campo de la ecotoxicología se pueden cumplir mediante uso de la metabolómica ecológica. Sin embargo, la implementación a gran escala de la metabolómica ecológica aún plantea algunos retos. Las diferentes técnicas analíticas presentan distinta capacidad y sensibilidad para determinar los diferentes tipos de metabolitos (polares - no polares, volátiles - no volátiles). Las dos plataformas tecnológicas más utilizadas para identificar y cuantificar metabolitos son: la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS), esta última casi siempre acoplada a técnicas cromatográficas como la cromatografía líquida (LC-MS), la cromatografía de gases (GC-MS), o en menor medida la electroforesis capilar (CE-MS). Como consecuencia de la gran diversidad de plataformas analíticas utilizadas y la compleja naturaleza química de los metabolitos, la identificación de la estructura de estos se ha convertido en uno de los principales retos para convertir los datos crudos de RMN y MS en conocimiento bioquímico. Faltan bases de datos de productos naturales, hecho especialmente limitante en el estudio de las plantas que presentan un gran número de metabolitos secundarios. Tan solo un 10 % de los metabolitos descritos en el metabolismo y anotados en bases de datos tienen información espectral, lo que sin duda está dificultando el uso generalizado de la metabolómica. La razón principal de este bajo porcentaje es el número relativamente pequeño de metabolitos disponibles comercialmente en forma de estándares puros, por no mencionar la gran cantidad de metabolitos con estructuras químicas desconocidas que aún no se han identificado. Por lo tanto, el desarrollo de bases de datos espectrales es esencial para que la metabolómica alcance el estado de madurez dentro de las otras ciencias ómicas.

PERSPECTIVAS Y ALCANCES

Los factores de riesgo para la vida silvestre aumentan exponencialmente; por ello, mitigar los efectos de la exposición se vuelve un problema complejo y difícil de abordar. Las especies son cada vez más vulnerables al desarrollo de enfermedades en el ambiente ante la presencia de diversos estresores. Por lo tanto, el primer aspecto de la metabolómica ecológica que resulta más sugerente desde un enfoque ecotoxicológico y de vulnerabilidad ecológica, es la permisible identificación de baterías de biomarcadores o perfiles metabólicos que contribuyan a mejorar los actuales sistemas de evaluación de la contaminación, mejorándolos en selectividad, especificidad e incluso permitiendo matizar entre fases de una enfermedad en la biota o su detección temprana evitando así la pérdida de especies. El segundo aspecto es como herramienta capaz de informar vías con resultados adversos (AOP) ante diversos estresores tales como los presentados en la tabla 1.

Tabla 1. Evaluación de vías con resultados adversos provocadas por diversos estresores, utilizando herramientas metabolómicas

| ECOSISTEMA | ESPECIE | ESTRESOR | VÍAS CON RESULTADOS ADVERSOS (AOP) | REFERENCIAS |
|--|---------------------------------------|--------------------------------------|---|-------------|
| Acuático | <i>Lithobates clamitans</i> | Herbicidas individuales | Metabolismo de la galactosa | 60 |
| | | | Síntesis-tRNA | |
| | | | Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato | |
| | | | Metabolismo de la cisteína y la metionina | |
| | | | Metabolismo de la purina | |
| | | | Metabolismo del fosfato de Inositol | |
| | | | Metabolismo de glicina, serina y trionina | |
| | | Mezclas de herbicidas | Biosíntesis de aminoacilo-tRNA | |
| | | | Metabolismo de la galactosa | |
| | | | Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato | |
| | | | El metabolismo de la arginina y prolina | |
| | | | metabolismo de beta-alanina | |
| | | | Metabolismo de glutatión | |
| | | | metabolismo de pirimidina | |
| Metabolismo de la cisteína y metionina | | | | |
| Metabolismo de azufre | | | | |
| Metabolismo de la sacarosa | | | | |
| Metabolismo de piruvato | | | | |
| Acuático | <i>Sparus aurata</i> | Oxibenzona | Metabolismo de los aminoácidos (fenilalanina y tirosina) | 64 |
| Acuático | <i>Lithobates catesbeiana</i> | Tiroxina | Metabolismo de lípidos señalización de lípidos | 59 |
| Terrestre | <i>Aves</i> | Cipermetrina | Metabolismo de los lípidos | 65 |
| Acuático | <i>Paracentrotus lividus</i> | Nanopartículas de dióxido de Titanio | Metabolismo de los lípidos, metabolismo antioxidante de las vías pentosa fosfato, cisteína-metionina, vías del metabolismo de glicina-serina | 66 |
| Terrestre | <i>Mus musculus</i> | Material particulado menor a 2,5 µm | Metabolismo de glicina, serina y treonina, biosíntesis de aminoacil-ARNt, cisteína y metionina. Metabolismo, metabolismo de alanina, aspartato y glutamato, metabolismo de metano, metabolismo del ácido linoleico y valina y biosíntesis de leucina e isoleucina | 67 |
| Terrestre | <i>Lumbricus rubellus Hoffmeister</i> | Cobre | Metabolismo energético azucares y aminoácidos ATP | 68 |
| Terrestre | <i>Dicerorhinus sumatrensis</i> | Hierro | Catabolismo y anabolismo de aminoácidos y carbohidratos | 69 |
| Terrestre | <i>Apis mellifera</i> | <i>N. ceranae</i> | Vía del ácido cítrico | 70 |

Tabla 1. (Continuación). Evaluación de vías con resultados adversos provocadas por diversos estresores, utilizando herramientas metabolómicas

| ECOSISTEMA | ESPECIE | ESTRESOR | VÍAS CON RESULTADOS ADVERSOS (AOP) | REFERENCIAS |
|------------|--|--------------------------|---|-------------|
| Terrestre | <i>Ratus</i> | Mezcla de pesticidas | Metabolismo de ácidos tricarboxílicos, carbohidratos, lípidos y aminoácidos | 71 |
| Acuático | <i>Carassius auratis</i> | Glifosato | Metabolismo del estrés oxidativo, metabolismo energético, metabolismo de aminoácidos y metabolismo de nucleósidos | 72 |
| Terrestre | <i>Eisenia fetida</i> | Atrazina | Síntesis del ATP | 73 |
| Acuático | <i>Diporeia</i> | Condiciones ambientales | Metabolitos de procesos fisiológicos | 74 |
| Terrestre | Ratones | Mezcla de pesticidas | Metabolismo de Carbohidratos | 75 |
| Acuático | <i>Lithobates sphenoccephala</i> | Mezcla de pesticidas | Metabolismo de regulación de aminoácidos, metabolismo del glutatión | 76 |
| Terrestre | <i>Eisenia fetida</i> | Trifluralin y endosulfán | Metabolismo de leucina, fenilalanina, triptófano, lisina, glutamato, valina, glicina, isoleucina, metionina, glutamina, alanina, maltosa, glucosa, malato, fumarato y ATP | 77 |
| Acuático | <i>Callogorgia delta</i> | Hábitat | Huellas metabolómicas | 78 |
| Acuático | <i>Xenopus laevi</i> | Edad | Metabolismo de alanina y síntesis del ADN | 79 |
| Acuático | <i>Anaxyrus americanus-Hyla versicolor</i> | Atrazina | Metabolismo de la energía y ácidos grasos | 57 |
| Acuático | <i>Limnodynastes peronii</i> | Vinclozolin | Metabolismo de la esteroidogénesis | 80 |

Resulta evidente la necesidad de la implementación de estas herramientas en biota de diferentes ecosistemas y en distintos escenarios con problemáticas ambientales complejas. Evaluar la respuesta a mezclas de contaminantes representa un importante desafío, sobre todo, al momento de definir los vínculos causales de los efectos donde el enfoque tradicional resulta insuficiente. No obstante, cuando dichos vínculos son evidenciados a través de los niveles biológicos de organización como el metaboloma y las AOP, las respuestas mecanicistas pueden usarse de manera confiable en la toma de decisiones para proteger especies de importancia ecológica, económica y cultural.

En la tabla 1 se muestra que el reporte de las vías de resultados adversos (AOP) se percibe en un marco conceptual de la metabolómica, como una herramienta que organiza el conocimiento existente sobre los vínculos biológicamente plausibles entre la perturbación a nivel molecular de un sistema biológico y un resultado adverso

en la organización biológica de relevancia regulatoria. Por lo tanto, la organización sistemática de la información metabolómica en marcos AOP, tiene el potencial de mejorar la toma de decisiones regulatorias a través de una mayor integración y un uso más significativo de los datos mecanicistas.

Por ejemplo, en peces, la disminución de la síntesis de vitelogenina (VTG) es un biomarcador de la alteración endocrina y un evento clave en varios AOP, incluidos los que relacionan la disfunción reproductiva con andrógenos o las interacciones de los receptores de estrógenos. Para algunos anfibios la exposición a un contaminante altera el gasto energético, el cual se puede evidenciar por algún biomarcador como la glucosa o los lípidos. Sin embargo, en estos procesos los puntos finales energéticos de un evento AOP rara vez se incorporan a la evaluación de riesgo ecológico siendo sumamente relevantes en procesos fisiológicos de supervivencia, reproducción, y crecimiento, los cuales

son determinantes en la conservación de una especie y en la salud del ecosistema. Por lo tanto, la metabolómica tiene el potencial de informar y brindar apoyo fisiológico para el análisis de las AOP que incorporan este tipo de eventos clave, apuntando a la posible identificación de los mismos previamente no definidos. De hecho, la metabolómica puede medir los cambios en los metabolitos endógenos involucrados en una amplia variedad de vías bioquímicas, y asociar esos cambios con la exposición a sustancias químicas específicas y concluir en los resultados biológicos adversos AOP. Por lo tanto, el examen de aquellas vías perturbadas por una exposición química puede ser útil para identificar un rango de impactos y cualquier posible interacción y vulnerabilidad del receptor. Posteriormente, esto puede apuntar hacia eventos adicionales de inicio molecular y AOP previamente insospechados que pueden ser relevantes para un producto químico en particular, ayudando a predecir la toxicidad de los contaminantes que actúan a través de numerosas vías bajo distintos escenarios ecosistémicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento de la investigación por parte del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología a través del proyecto SEMARNAT-CONACYT 2017-2018 con número A3-S-78964 y FSSEP02-C-2018-1 con número A1-S-27598.

BIBLIOGRAFÍA

- Global Biodiversity. [citado 16/05/2019] Disponible en: <https://www.cbd.int/gbo3/?pub=6667§ion=6705>.
- What is Ecosystem Health?. [citado 16/05/2019] Disponible en: <https://www.seadocsociety.org/what-is-ecosystem-health>.
- Ippolito A, Sala S, Faber JH, Vighi M. Ecological vulnerability analysis: A river basin case study. *Sci Total Environ*. 2010; 408(18):3880–90.
- Weißhuhn P, Müller F, Wiggering H. Ecosystem Vulnerability Review: Proposal of an Interdisciplinary Ecosystem Assessment Approach. *Environ Manage*. 2018; 61(6):904–15.
- Burkhard B, Müller F, Lill A. Ecosystem Health Indicators. En: *Ecological Indicators*, vol [2] of *Encyclopedia of Ecology*, 5 vols. 2008. p. 1132–8.
- Bundy, J.G., Davey, M.P. & Viant, M.R. Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics*, 2009; 5(1):3
- Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genomics* 2001; 2(3):155–68.
- Sardans J, Peñuelas J, Rivas-Ubach A. Ecological metabolomics: overview of current developments and future challenges. *Chemoecology*, 2011; 21(4):191–225.
- European Bioinformatics Institute. What is metabolomics?. [citado 22/01/2019] Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/introduction-metabolomics/what-metabolomics>.
- Metabolismo Celular. [citado 16/01/2019]. Disponible en: <http://www.objetos.unam.mx/biologia/metabolismoCelular/index.html>.
- Portal Académico del CCH. [citado 16/01/2019] Disponible en: <https://portalacademico.cch.unam.mx/alumno/biologia1/unidad2/metabolismo/definicion>.
- Arbona Mengual V, López Climent MF, Pérez Clemente RM, Gómez Cadenas A. La metabolómica como herramienta para la evaluación fisiológica y nutricional en citricultura. *Revista Internacional de cítricos*, 2014; 2(1):104-8.
- Barbas Coral RD. La ventana de la metabolómica, vislumbrando el panorama de sus aplicaciones. *La metabolómica*, 2015; 186:11.
- Sardans, Jordi RU Albert, Peñuelas, Josep. Ecometabolómica | Investigación y Ciencia | Investigación y Ciencia. [citado 19/03/2019] Disponible en: <https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/el-origen-de-la-multicelularidad-568/ecometabolmica-10804>.
- Metabolomics: Understanding Metabolism in the 21st Century - MOOC. [citado 19/03/2019] Disponible en: <https://www.birmingham.ac.uk/postgraduate/courses/moocs/metabolomics.aspx>.
- Eggen RIL, Behra R, Burkhardt-Holm P, Escher BI, Schweigert N. Challenges in ecotoxicology. *Environ Sci Technol*. 2004; 38(3):58A-64A.
- Poulin RX, Pohnert G. Simplifying the complex: metabolomics approaches in chemical ecology. *Anal Bioanal Chem*. 2019; 411(1):13–9.
- Matich EK, Chavez Soria NG, Aga DS, Atilla-Gokcumen GE. Applications of metabolomics in assessing ecological effects of emerging contaminants and pollutants on plants. *J Hazard Mater*. 2019 ;373:527–35.
- Simmons DBD, Benskin JP, Cosgrove JR, Duncker BP, Ekman DR, Martyniuk CJ, et al. Omics for aquatic ecotoxicology: Control of extraneous variability to enhance the analysis of environmental effects. *Environ Toxicol Chem*. 2015; 34(8):1693–704.
- Methodologies and applications in the environmental sciences. [citado 19/03/2019] Disponible en: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpestics/31/3/31_3_245/_article.
- Bedia C, Cardoso P, Dalmau N, Garreta-Lara E, Gómez-Canela C, Gorrochategui E, et al. Data Analysis for Omic Sciences: Methods and Applications. 2018; 82:533–82.
- Viant MR, Werner I, Rosenblum ES, Gantner AS, Tjeerdema RS, Johnson ML. Correlation between heat-shock protein induction and reduced metabolic condition in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) chronically exposed to elevated temperature. *Fish Physiol Biochem*. 2003; 29(2):159–71.
- Cao M, Wang D, Mao Y, Kong F, Bi G, Xing Q, et al. Integrating transcriptomics and metabolomics to characterize the regulation of EPA biosynthesis in response to cold stress in seaweed *Bangia fuscopurpurea*. *PLOS ONE*, 2017; 12(12):e0186986.
- Gandar A, Laffaille P, Canlet C, Tremblay-Franco M, Gautier R, Perrault A, et al. Adaptive response under multiple stress exposure in fish: From the molecular to individual level. *Chemosphere*. 2017; 188:60–72.
- Serra-Compte A, Álvarez-Muñoz D, Solé M, Cáceres N, Barceló D, Rodríguez-Mozaz S. Comprehensive study of sulfamethoxazole effects in marine mussels: Bioconcentration, enzymatic activities and metabolomics. *Environ Res*, 2019; 173:12–22.

26. Viant MR. Improved methods for the acquisition and interpretation of NMR metabolomic data. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 310(3):943–8.
27. Zhang W, Tan NGJ, Fu B, Li SFY. Metallomics and NMR-based metabolomics of *Chlorella* sp. reveal the synergistic role of copper and cadmium in multi-metal toxicity and oxidative stress. *Met Integr Biometal Sci.* 2015; 7(3):426–38.
28. Bonnefille B, Gomez E, Alali M, Rosain D, Fenet H, Courant F. Metabolomics assessment of the effects of diclofenac exposure on *Mytilus galloprovincialis*: Potential effects on osmoregulation and reproduction. *Sci Total Environ.* 2018; 613–614:611–8.
29. Maisano M, Cappello T, Natalotto A, Vitale V, Parrino V, Giannetto A, et al. Effects of petrochemical contamination on caged marine mussels using a multi-biomarker approach: Histological changes, neurotoxicity and hypoxic stress. *Mar Environ Res.* 2017; 128:114–23.
30. Thouvenot L, Deleu C, Berardocco S, Hauray J, Thiébaud G. Characterization of the salt stress vulnerability of three invasive freshwater plant species using a metabolic profiling approach. *J Plant Physiol.* 2015; 175:113–21.
31. Holzinger A, Karsten U. Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological and molecular mechanisms. *Front Plant Sci.* 2013; 4:327.
32. Chou L, Kenig F, Murray AE, Fritsen CH, Doran PT. Effects of legacy metabolites from previous ecosystems on the environmental metabolomics of the brine of Lake Vida, East Antarctica. *Org Geochem.* 2018; 122:161–70.
33. Riedl J, Kluender C, Sans-Piché F, Heilmeier H, Altenburger R, Schmitt-Jansen M. Spatial and temporal variation in metabolic fingerprints of field-growing *Myriophyllum spicatum*. *Aquat Bot.* 2012; 102:34–43.
34. Hou J, Wang L, Wang C, Zhang S, Liu H, Li S, et al. Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *J Environ Sci.* 2019; 75:40–53.
35. Revel M, Châtel A, Mouneyrac C. Omics tools: New challenges in aquatic nanotoxicology? *Aquat Toxicol Amst Neth.* 2017; 193:72–85.
36. Teng M, Zhu W, Wang D, Qi S, Wang Y, Yan J, et al. Metabolomics and transcriptomics reveal the toxicity of difenoconazole to the early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 2018; 194:112–20.
37. Barboza LGA, Vieira LR, Branco V, Figueiredo N, Carvalho F, Carvalho C, et al. Microplastics cause neurotoxicity, oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquat Toxicol.* 2018; 195:49–57.
38. Arukwe A, Myburgh J, Langberg HA, Adeogun AO, Braa IG, Moeder M, et al. Developmental alterations and endocrine-disruptive responses in farmed Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) exposed to contaminants from the Crocodile River, South Africa. *Aquat Toxicol.* 2016; ;173:83–93.
39. Ortiz-Villanueva E, Jaumot J, Martínez R, Navarro-Martín L, Piña B, Tauler R. Assessment of endocrine disruptors effects on zebrafish (*Danio rerio*) embryos by untargeted LC-HRMS metabolomic analysis. *Sci Total Environ.* 2018; 635:156–66.
40. Collins JP. Amphibian decline and extinction: what we know and what we need to learn. *Dis Aquat Organ.* 2010; 92(2–3):93–9.
41. Gibbons JW, Scott DE, Ryan TJ, Buhlmann KA, Tuberville TD, Metts BS, et al. The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians Reptile species are declining on a global scale. Six significant threats to reptile populations are habitat loss and degradation, introduced invasive species, environmental pollution, disease, unsustainable use, and global climate change. *BioScience.* 2000; 50(8):653–66.
42. Whitfield SM, Bell KE, Philippi T, Sasa M, Bolaños F, Chaves G, et al. Amphibian and reptile declines over 35 years at La Selva, Costa Rica. *Proc Natl Acad Sci.* 2007; 104(20):8352–6.
43. Brühl CA, Schmidt T, Pieper S, Alscher A. Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline? *Sci Rep.* 2013; 3:1135.
44. Hayes TB, Case P, Chui S, Chung D, Haeffele C, Haston K, et al. Pesticide Mixtures, Endocrine Disruption, and Amphibian Declines: Are We Underestimating the Impact?. *Environ Health.* 2006; 114(Suppl 1):40–50.
45. Rajaguru P, Kalpana R, Hema A, Suba S, Baskarathupathi B, Kumar PA, et al. Genotoxicity of some sulfur dyes on tadpoles (*Rana hexadactyla*) measured using the comet assay. *Environ Mol Mutagen.* 2001; 38(4):316–22.
46. Ralph S, Petras M, Pandrangi R, Vrzoc M. Alkaline single-cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. *Environ Mol Mutagen.* 1996; 28(2):112–20.
47. Denton RD, Bernot MJ. Effects of Multiple Agricultural Chemicals on Northern Leopard Frog, *Lithobates pipiens*, Larvae. *Proc Indiana Acad Sci.* 2011; 120(1/2):39–44.
48. Attademo AM, Peltzer PM, Lajmanovich RC, Basso A, Junges C. Tissue-Specific Variations of Esterase Activities in the Tadpoles and Adults of *Pseudis paradoxa* (Anura: Hylidae). *Water Air.* 2014; 225(3):1903
49. Cusaac JPW, Mimbs WH, Belden JB, Smith LM, McMurry ST. Terrestrial exposure and effects of Headline AMP® Fungicide on amphibians. *Ecotoxicology.* 2015; 24(6):1341–51.
50. Denoël M, D'Hooghe B, Ficetola GF, Bresseur C, De Pauw E, Thomé J-P, et al. Using sets of behavioral biomarkers to assess short-term effects of pesticide: a study case with endosulfan on frog tadpoles. *Ecotoxicology.* 2012; 21(4):1240–50.
51. Quaranta A, Bellantuono V, Cassano G, Lippe C. Why Amphibians Are More Sensitive than Mammals to Xenobiotics. *PLOS ONE.* 2009; 4(11):e7699.
52. Carlsson G, Tydén E. Development and evaluation of gene expression biomarkers for chemical pollution in common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018; 25(33):33131–9.
53. do Amaral DF, Montalvão MF, de Oliveira Mendes B, da Costa Araújo AP, de Lima Rodrigues AS, Malafaia G. Sub-lethal effects induced by a mixture of different pharmaceutical drugs in predicted environmentally relevant concentrations on *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura, ranidae) tadpoles. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019; 26(1):600–16.
54. do Amaral DF, Montalvão MF, de Oliveira Mendes B, da Silva Castro AL, Malafaia G. Behavioral and mutagenic biomarkers in tadpoles exposed to different abamectin concentrations. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018; 25(13):12932–46.
55. Jones-Costa M, Franco-Belussi L, Vidal FAP, Gongora NP, Castanho LM, Dos Santos Carvalho C, et al. Cardiac biomarkers as sensitive tools to evaluate the impact of xenobiotics on amphibians: the effects of anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018; 151:184–90.

56. Lambert MR, Skelly DK, Ezaz T. Sex-linked markers in the North American green frog (*Rana clamitans*) developed using DArTseq provide early insight into sex chromosome evolution. *BMC Genomics*. 2016; 17(1):844.
57. Snyder MN, Henderson WM, Glinski DA, Purucker ST. Biomarker analysis of American toad (*Anaxyrus americanus*) and grey tree frog (*Hyla versicolor*) tadpoles following exposure to atrazine. *Aquat Toxicol Amst Neth*. 2017; 182:184–93.
58. Ichu T-A, Han J, Borchers CH, Lesperance M, Helbing CC. Metabolomic insights into system-wide coordination of vertebrate metamorphosis. *BMC Dev Biol*. 2014; 14:5.
59. Luehr TC, Koide EM, Wang X, Han J, Borchers CH, Helbing CC. Metabolomic insights into the effects of thyroid hormone on *Rana [Lithobates] catesbeiana* metamorphosis using whole-body Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry Imaging (MALDI-MSI). *Gen Comp Endocrinol*. 2018; 265:237–45.
60. Van Meter RJ, Glinski DA, Purucker ST, Henderson WM. Influence of exposure to pesticide mixtures on the metabolomic profile in post-metamorphic green frogs (*Lithobates clamitans*). *Sci Total Environ*. mayo de 2018; 624:1348–59.
61. Cavalcante ID, Antoniazzi MM, Jared C, Pires OR, Sciani JM, Pimenta DC. Venomics analyses of the skin secretion of *Dermatonotus muelleri*: Preliminary proteomic and metabolomic profiling. *Toxicon*. 2017; 130:127–35.
62. Duellman WE, Trueb L. *Biology of Amphibians*. Edición: New Ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1994. 696 p.
63. Rodríguez C, Rollins-Smith L, Ibáñez R, Durant-Archibold AA, Gutiérrez M. Toxins and pharmacologically active compounds from species of the family Bufonidae (Amphibia, Anura). *J Ethnopharmacol*. 2017; 198:235–54.
64. Ziarrusta H, Mijangos L, Picart-Armada S, Irazola M, Perera-Lluna A, Usobiaga A, et al. Non-targeted metabolomics reveals alterations in liver and plasma of gilt-head bream exposed to oxybenzone. *Chemosphere*. 2018; 211:624–31.
65. Liu X, Liu C, Wang P, Liang Y, Zhan J, Zhou Z, et al. Distribution, metabolism and metabolic disturbances of alpha-cypermethrin in embryo development, chick growth and adult hens. *Environ Pollut Barking Essex 1987*. 2019; 249:390–7.
66. Aljagic A, Gaglio D, Napodano E, Russo R, Costa C, Benada O, et al. Titanium dioxide nanoparticles temporarily influence the sea urchin immunological state suppressing inflammatory-related gene transcription and boosting antioxidant metabolic activity. *J Hazard Mater*. 2020; 384.
67. Shi C, Han X, Mao X, Fan C, Jin M. Metabolic profiling of liver tissues in mice after instillation of fine particulate matter. *Sci Total Environ*. 2019; 696.
68. Bundy JG, Sidhu JK, Rana F, Spurgeon DJ, Svendsen C, Wren JF, et al. "Systems toxicology" approach identifies coordinated metabolic responses to copper in a terrestrial non-model invertebrate, the earthworm *Lumbricus rubellus*. *BMC Biol*. 2008; 6(1):25.
69. Watanabe M, Roth TL, Bauer SJ, Lane A, Romick-Rosendale LE. Feasibility Study of NMR Based Serum Metabolomic Profiling to Animal Health Monitoring: A Case Study on Iron Storage Disease in Captive Sumatran Rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*). *PLOS ONE*. 2016; 11(5):e0156318.
70. Broadrup RL, Mayack C, Schick SJ, Eppley EJ, White HK, Macherone A. Honey bee (*Apis mellifera*) exposomes and dysregulated metabolic pathways associated with *Nosema ceranae* infection. *PLoS ONE*. 2019; 14(3):1–18.
71. Cordier S, Bonvallot N, Canlet C, Blas-Y-Estrada F, Gautier R, Tremblay-Franco M, et al. Metabolome disruption of pregnant rats and their offspring resulting from repeated exposure to a pesticide mixture representative of environmental contamination in Brittany. *PLoS ONE*. 2018; 13(6):1–21.
72. Li M-H, Ruan L-Y, Zhou J-W, Fu Y-H, Jiang L, Zhao H, et al. Metabolic profiling of goldfish (*Carassius auratus*) after long-term glyphosate-based herbicide exposure. *Aquat Toxicol Amst Neth*. 2017; 188:159–69.
73. Dani VD, Simpson AJ, Simpson MJ. Analysis of earthworm sublethal toxic responses to atrazine exposure using 1 H nuclear magnetic resonance (NMR)-based metabolomics. *Environ Toxicol Chem*. 2018; 37(2):473–80.
74. Ralston-Hooper K, Hopf A, Oh C, Zhang X, Adamec J, Sepúlveda MS. Development of GCxGC/TOF-MS metabolomics for use in ecotoxicological studies with invertebrates. *Aquat Toxicol Amst Neth*. el 2 de junio de 2008;88(1):48–52.
75. Lukowicz C, Ellero-Simatos S, Régnier M, Polizzi A, Lasserre F, Montagner A, et al. Metabolic Effects of a Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Pesticide Cocktail in Mice: Sexual Dimorphism and Role of the Constitutive Androstane Receptor. *Environ Health Perspect*. 2018; 126(6):067007.
76. Glinski DA, Purucker ST, Meter RJV, Black MC, Henderson WM. Endogenous and exogenous biomarker analysis in terrestrial phase amphibians (*Lithobates sphenoccephala*) following dermal exposure to pesticide mixtures. *Environ Chem*. 2018; 16(1):55–67.
77. Yuk J, Simpson MJ, Simpson AJ. 1-D and 2-D NMR metabolomics of earthworm responses to sub-lethal trifluralin and endosulfan exposure. 2011; 8(3):281–94.
78. Vohsen SA, Fisher CR, Baums IB. Metabolomic richness and fingerprints of deep-sea coral species and populations. *Metabolomics*. 2019. 15; 34-38.
79. Vastag L, Jorgensen P, Peshkin L, Wei R, Rabinowitz JD, Kirschner MW. Remodeling of the Metabolome during Early Frog Development. 2011; 6(2): e16881.
80. Melvin SD, Leusch FDL, Carroll AR. Metabolite profiles of striped marsh frog (*Limnodynastes peronii*) larvae exposed to the anti-androgenic fungicides vinclozolin and propiconazole are consistent with altered steroidogenesis and oxidative stress. *Aquat Toxicol Amst Neth*. 2018; 199:232–9.