



Universidad de Valparaíso
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología y Ciencias Ambientales

Evaluación de la genotoxicidad de las aguas de las desembocaduras de los ríos Aconcagua, Maipo y Catapilco (Chile central) sobre los peces *Mugil cephalus* y *Odontesthes brevianalis*.

Unidad de investigación para optar al grado de licenciado en
Ciencias mención Biología

Diana Angélica Carvajal Vásquez

Director

Dr. Hernán Gaete Olivares

**Valparaíso, Chile
2012**

Agradecimientos y Dedicatoria:

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Antes que todo, agradezco a Dios por guiar mis pasos estos cinco maravillosos años, por ayudarme a terminar este proyecto, gracias por darme la fuerza y el coraje para hacer este sueño realidad.

Agradecer al Dr Hernán Gaete, por haber confiado en mi persona, por la paciencia y dirección de este trabajo.

Me gustaría agradecer sinceramente a la Dra Rosa Guerra, por entregarme sus conocimientos, orientaciones, persistencia, paciencia y su motivación las que han sido fundamentales para mi formación como investigadora. Ella ha inculcado en mí seriedad, responsabilidad y rigor académico sin los cuales, no podría tener una formación completa como investigadora. A su manera, ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración, así como sentirme en deuda con ella por todo lo recibido durante el periodo de tiempo que ha durado la tesis.

También me gustaría agradecer por los consejos recibidos a lo largo de los últimos años al profesor Juan Carlos Espinoza, quien me alentó y motivo durante toda mi formación. Agradecer al profesor Gonzalo Riveros por su apoyo cada vez que lo necesite y por su disposición para ayudarme.

De igual manera agradecer a mi querido profesor Mauricio Fuentealba quien me apoyó, aconsejó y me entregó un trato humano y visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, que me ayudaron a formarme como persona e investigadora. No cabe duda que su participación ha enriquecido el trabajo realizado y además, ha significado el surgimiento de una sólida amistad.

Me gustaría al profesor Esteban Aliga quien tuvo disponibilidad de facilitarme materiales para desarrollar el trabajo. A Francisco Aguilera quien me orientó con la técnica y tuvo siempre excelente disposición para aclarar mis dudas. Al profesor Sergio Zunino por acompañarme en las salidas a terreno y por sus ganas de enseñarme y guiarme en este trabajo.

A Carlos Jara, por su apoyo y por facilitarme los medios para llevar a cabo las actividades durante el desarrollo de mi tesis. A Claudio Gallardo por su buena disposición para aclarar dudas, enseñar y descargar material científico de revistas y Journals (Science Direct, ACS, RCS, Wiley, Springer).

Agradecer a mis compañeras de laboratorio Pía Bolados, Macarena Mukarker y Violeta Zumaeta quienes convirtieron el ambiente de trabajo en un lugar de alegría. Su visión, motivación y optimismo me han ayudado en momentos muy críticos de la Tesis.

Gracias también a mis queridos compañeros, y amigos que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida. Carlos Arenas, Romina Carrasco, Andrés Canales, Yasna Díaz, Daniela de Giorgis, Alex Inostroza, Camila Méndez, Constanza Müller, Diego Ojeda, gracias.

A mi querida prima Claudia quien me aconsejo y apoyo durante toda mi vida universitaria. Gracias primita, te quiero mucho.

Con mucho cariño principalmente a mis padres que me dieron la vida, que creyeron en mí, que han estado conmigo en todo momento, que me han dado ejemplos dignos de superación y porque gracias a ustedes hoy puedo ver alcanzar mi meta. Gracias por todo Papá y Mamá, porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo salir hasta el final. Va por Ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y porque los AMO.

A mis hermanos gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida, son parte de mi vida y motivación. A ti Marianita, por ser como mi segunda madre y mi eterna aliada, tu y yo sabemos lo que nos ha costado salir adelante, pero aquí estamos unidos como siempre.

Por último y no menos importante le dedico con todo mi amor y cariño este trabajo a mi pololo, Gustavo Verdugo, quien estuvo presente en cada momento, fue la principal persona que me alentó y me apoyó siempre a no flaquear. Gracias por acompañarme y por ser un gran soporte en mi vida, TE AMO.

No me puedo ir sin antes decirle que sin ustedes a mi lado no hubiera logrado este trabajo y aquí está el fruto. Les agradezco a todos ustedes con toda mi alma el haber llegado a mi vida y el compartir momentos agradables y momentos tristes, pero son esos momentos los que nos hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean.

Índice

I. Resumen	8
Abstract	9
II. Introducción	10
1. Características e importancia de los estuarios.	12
2. Factores que modifican las propiedades de los Estuarios.	13
3. Agua residual de origen industrial, agrícola y ganadera.	14
4. Metales pesados.	16
4.1 Factores que afectan la acumulación y su biodisponibilidad.	19
4.2 Dinámica de los metales pesados.	20
5. Descripción de <i>Mugil cephalus lisa</i> (Pez Liza).	21
6. Descripción de <i>Odontesthes brevianalis</i> (Cauque).	23
7. ¿Por qué estudiar el efecto genotóxico de sustancias contaminantes en peces?	25
8. Biomarcador.	26
9. Desarrollo histórico de la técnica.	30
10. Aplicaciones.	32
11. Ventajas y limitaciones del ensayo.	35
III. Planteamiento del problema	37
IV. Hipótesis	38
V. Objetivos generales y específicos	39
VI. Materiales y Métodos	40
12. Estandarización de la técnica del cometa bajo las condiciones de laboratorio.	40
13. Caracterización de las especies <i>Mugil cephalus lisa</i> y <i>Odontesthes brevianalis</i> .	41
14. Determinación de las características fisicoquímicas del agua.	44
14.1 Análisis de la muestra de agua.	44
14.2 Determinación de los metales traza en branquias.	44
15. Obtención de la muestra de sangre en <i>Mugil cephalus</i> y <i>Odontesthes brevianalis</i>	45
15.1 Viabilidad celular.	47
15.2 Muestra control.	48
16. Protocolo estándar	49
16.1 Preparación de la agarosa.	49
16.2 Preparación de los microgeles de agarosa.	50

16.3	Lisis celular.	52
16.4	Desnaturalización y Electroforesis.	53
16.5	Neutralización y fijación.	54
16.6	Tinción y visualización.	55
16.7	Medición de Daños.	56
17	Estadística.	59
VII.	Resultados	58
VIII.	Discusión	70
IX.	Conclusión	83
X.	Anexos	
	· Figuras	
	Figura 1: Dieta que van adoptando los peces en las diversas etapas de su desarrollo.	22
	Figura 2: Esquema de la aplicación del ensayo del cometa en modelos que van desde bacterias a humanos.	32
	Figura 3: Proceso de captura de peces.	41
	Figura 4: <i>Odontesthes brevianalis</i> y <i>Mugil cephalus lisa</i> .	42
	Figura 5: Mapa de la región de Valparaíso: Lugares de muestreo.	43
	Figura 6: Disección.	45
	Figura 7: Extracción de sangre en los peces.	46
	Figura 8: Viabilidad celular.	47
	Figura 9: Muestra control.	48
	Figura 10: Preparación de la primera capa de agarosa 1%.	50
	Figura 11: Mezcla celular, agrosa al 1% y buffer fosfato salino.	50
	Figura 12: Preparación final de los microgeles de agarosa.	51
	Figura 13: Lisis alcalina.	52
	Figura 14: Cámara de electroforesis junto a las preparaciones.	53
	Figura 15: Preparaciones sometidas a neutralización.	54
	Figura 16: Microscopio de epifluorescencia.	55
	Figura 17: Clasificación visual sugerida por Collins.	57
	Figura 18: Correlación entre el factor de condición y el daño genético (TCS) en <i>Mugil cephalus lisa</i> y <i>Odontesthes brevianalis</i> .	60
	Figura 19: Correlación de la concentración Cu presentes en branquias y el TCS.	66
	Figura 20: Correlación de la concentración Pb presentes en branquias y el TCS.	67
	Figura 21: Correlación de la concentración Zn presentes en branquias.	68

· Tablas	
Tabla 1: Estandarización de la Técnica bajo condiciones de Laboratorio.	58
Tabla 2: Relación entre la masa Corporal y la longitud.	59
Tabla 3: Caracterización fisicoquímica de la muestra de agua.	61
Tabla 4: Concentración de metales totales en la muestra de agua.	62
Tabla 5: Rango de la concentración de metales en branquias en <i>Mugil cephalus</i> y <i>Odontesthes brevianalis</i> estudiadas en el río Aconcagua, Maipo y Catapilco.	63
Tabla 6 : Calculo del factor de bioacumulación	64
Tabla 7: Cuantificación del daño total de la muestra de sangre.	65
Tabla 8: Coeficiente de Correlación de Pearson (r) entre los resultados de bioensayo y las concentraciones de metales medidas.	69
· Glosario	84
XII. Bibliografía.	87

Resumen

El aumento de la contaminación de los ecosistemas estuarinos, ha llevado a un creciente interés en determinar los efectos sobre los organismos que viven en estos ambientes, principalmente por las elevadas concentraciones de metales pesados generados a raíz de la fuerte extracción minera que ocurre cercana a estas zonas.

El uso de organismos acuáticos como indicadores biológicos han demostrado ser útil para el monitoreo ambiental ya que, son capaces de acumular contaminantes y mostrar diferentes respuestas ante su exposición a agentes antropogénicos. En esta investigación se evaluó la genotoxicidad de las aguas de las desembocaduras del río Aconcagua, Maipo y del estero de Catapilco en muestras de sangre de peces *Mugil cephalus lisa* y *Odontesthes brevianalis* mediante el uso del ensayo del cometa. Además, se evaluaron las concentraciones de Cu, Pl y Zn en muestras de agua y tejidos branquiales.

Los resultados muestran que las concentraciones de Cu, Pl y Zn analizadas en las muestras de agua, se encuentran dentro del intervalo de contenido normal, a excepción de la concentración de Pl de la desembocadura del río Maipo (0,18 mg/L), que sobre pasa el límite máximo permitido. Además, se encontraron altas concentraciones de Zn en tejidos branquiales, principalmente en la especie *Odontesthes brevianalis* de la desembocadura del río Maipo (35,6 mg/Kg) y del estero de Catapilco (30,6 mg/Kg).

Con respecto al ensayo del cometa, las especies de la desembocadura del río Maipo presentaron altos y significativos niveles de genotoxicidad, en comparación a las especies del estero de Catapilco y río Aconcagua.

Este estudio demuestra que a pesar de las bajas concentraciones de metales presentes en el agua superficial, puede haber una buena bioacumulación en algunos peces, el hecho de que las concentraciones de metal en el agua sean más bajas que los encontrados en tejidos es motivo de alerta si los niveles de agua siguen aumentando.

Palabras claves: Ensayo del cometa, Metales pesados, Antropogénicos, *Mugil cephalus* y *Odontesthes brevianalis*.

Abstract

The increasing pollution of estuarine ecosystems, has led to increased interest in determining the effects on organisms living in these environments, mainly by high concentrations of heavy metals generated as a result of strong mining occurring near these zones.

The use of aquatic organisms as biological indicators have proven useful for environmental monitoring because they are able to accumulate contaminants and show different responses to exposure to agents anthropogenic. This research evaluated the genotoxicity of water at the mouths of the river Aconcagua, Maipo and Catapilco estuary in blood samples of fish *Mugil cephalus* and *Odontesthes brevianalis* using the comet assay. In addition, we evaluated the concentrations of Cu, Zn PI and water samples and gill tissues.

The results show that concentrations of Cu, Zn PI and analyzed water samples are within the range of normal content, except for the concentration of PI in the mouth of the Maipo River (0.18 mg / L), surpasses the maximum allowed. It also, found high concentrations of Zn in gill tissue, mainly in the species *Odontesthes brevianalis* the mouth of the Maipo River (35.6 mg / kg) and the estuary of Catapilco (30.6 mg / kg).

With respect to the comet assay, species of the mouth of the Maipo River showed high and significant levels of genotoxicity, compared to species of the estuary and river Aconcagua Catapilco.

This study demonstrates that despite the low concentrations of metals in surface water, there may be a good bio-accumulation in some fish, the fact that metal concentrations in water are lower than those found in tissues is of alert if water levels continue to rise.

Key words: Comet assay, Heavy Metals, Anthropogenic, *Mugil cephalus* and *Odontesthes brevianalis*.

Introducción

Uno de los temas más preocupantes en la actualidad es la contaminación acuática que recibe grandes cantidades de residuos derivados directamente de la industria, agricultura, asentamientos urbanos o indirectamente de las emisiones del aire (Márquez, 2008; Buschman & Fortt, 2010; Ghisi, 2010; Scalón, 2010; Laxmi, 2011). Los estuarios y los océanos se pueden considerar los últimos receptores de una gran cantidad de sustancias químicas que son vertidas de forma voluntaria o accidental por las actividades humanas. Los impactos más intensos e inmediatos de tales actividades se localizan en la zona costera en la que los asentamientos humanos y el desarrollo de industrias se han incrementando notablemente en las últimas décadas. Por otra parte, los aportes difusos, como las prácticas agrícolas, lavado de suelos contaminados, son factores adicionales y menos controlables, como consecuencia, muchos ecosistemas críticos, algunos únicos en el mundo han sido alterados mas allá de su capacidad de recuperación (Ferrano, 2004; Jayaprakash, 2005; Ahmed, 2011).

Los vertidos de origen urbano e industrial pueden contener sustancias nocivas para los organismos estuarinos, marinos e incluso para el hombre como organismo consumidor, tales sustancias son metales pesados, aceites, grasas, fenoles, entre otros. Las sustancias tóxicas como metales pesados son bioacumulables y presentan largos periodos de vida media. En los últimos años se han detectado concentraciones de metales pesados en peces afectando los mecanismos moleculares, provocando alteraciones genéticas y fisiológicas (Castañe, 2003; Simoniello, 2009; Hoshina y Marin-Morales, 2010; Ahmed et al., 2011).

En la actualidad casi no existen estuarios limpios. A pesar de la gran cantidad de vertidos que estos reciben, la contaminación no suele ser tan abundante. Debido fundamentalmente al continuo flujo y reflujo mareal, donde por lo general la tasa de renovación de las aguas en los estuarios es alta. En zonas interiores donde la salinidad es inferior, se produce la floculación del material particulado de muy pequeño tamaño, posibilitando la sedimentación del mismo. De esta manera, diversas sustancias contaminantes, quedan atrapadas en el sedimento. Sin embargo, este carácter filtrador puede actuar en determinadas condiciones como fuente de contaminación, puesto que el sedimento al ir acumulando una gran cantidad sustancias pierde la capacidad de actuar como filtrador (Belpaeme, 1998; Jayaprakash et al., 2005, Solaun, 2009).

Los estuarios cumplen un papel crítico en el funcionamiento del planeta. Las fuentes terrestres de contaminación de las franjas costeras y del mar deberían ocupar una posición destacada en la temática ambiental. Sin embargo esto aun no ocurre. La alteración y destrucción del hábitat, la eutrofización, la disminución de las poblaciones de peces y otros recursos vivos, los efectos en la salud humana, cambios en el flujo de sedimentos, son aspectos vinculados a las fuentes fijas y difusas de la contaminación producida por actividades que tienen lugar en tierra y que por el efecto de captación de agua que tienen las cuencas hidrográficas, generan cambios concentrados en las desembocadura de los ríos y en las zonas costeras aledañas (Escobar et al., 2002; Márquez et al., 2008; Mohanty, 2011).

1. Características e Importancia de los Estuarios

Los estuarios son cuerpos de agua costeros, semi cerrados con una conexión libre con el mar abierto, que se mezcla progresivamente con el agua dulce proveniente de drenaje terrestre, esta interacción entre los dos tipos de agua trae como consecuencia variaciones en la salinidad del sistema (Pritchard, 1967). En algunos estuarios la mezcla entre el agua dulce y el agua de mar es bastante homogénea, mientras que en otros sitios se forman dos capas, la superior de agua dulce y la inferior de agua salada por ser mucho más densa. Aunque las condiciones físicas a menudo son difíciles, existen organismos que se adaptan a las condiciones de salinidad y temperatura, mientras que otros al ser menos tolerantes al medio no pueden subsistir y mueren.

En las zonas estuarinas se encuentran especies nativas (especies confinadas a la zona) y especies introducidas que vienen a desovar o a pasar parte de su ciclo de vida (Márquez et al., 2008; Zunino, 2009).

Los estuarios son muy importantes, ya que son sectores de alta productividad que son cruciales para la historias de vida de muchos invertebrados, peces y aves (Márquez et al., 2008). En consecuencia, la sostenibilidad de estos cuerpos de aguas es de vital importancia para las regiones costeras tanto en términos ecológicos como económicos. (Díaz- Jamarillo, 2010).

2. Factores que modifican las propiedades de los estuarios:

- *Alteración en la cantidad y afluencia del agua dulce*

Una disminución de la afluencia de agua dulce puede aumentar el impacto de la contaminación, destrucción del hábitad, alteración de los suelos y reducción de un estuario (Cardona, 2000). Las intervenciones humanas también pueden tener como resultado un aumento de la afluencia de agua dulce, afectando a los organismos del estuario adaptados al flujo y a las condiciones de salinidad real (Montagna, 2002).

La afluencia de agua dulce también cumple una función clave en la mezcla de aguas de los estuarios. Cuando disminuyen o se agotan las afluencias de agua dulce, las condiciones de salinidad (condición más baja) pueden cambiar causando la desaparición de las especies. Por otra parte, una gran afluencia de agua dulce puede causar baja concentración de oxígeno en las aguas de fondo trayendo como consecuencia la muerte de los organismos acuáticos, cambios en la estructura comunitaria, entre otros efectos. Generalmente el viento y las mareas previenen esta situación. Cuando la afluencia de agua dulce es muy grande y las corrientes de la marea junto a los vientos son casi nulos, puede ocurrir eventos de hipoxia (baja concentración de oxígeno) o anoxia (ausencia de oxígeno) en las aguas del fondo. (Rabalais & Nixon, 2002; Buschmann & Fortt et al., 2005).

- *Afluencia de los sedimentos:*

Cuando no hay una recarga suficiente de sedimentos ricos en nutrientes, los humedales pueden deteriorarse, afectando a las comunidades de animales, especialmente a los peces que lo utilizan como área de crías.

Algunos contaminantes pueden quedar atrapados en los sedimentos mientras que otros pasan directamente a la columna de agua (Licata, 2003). La alteración de la afluencia de agua dulce en los estuarios puede cambiar la carga de sedimentos que se transportan al estuario y a la costa (Ittekkot, 2000; Nixon, 2003). Muchas especies pasan parte de su vida en contacto con los sedimentos, esto supone una vía de paso de sustancias potencialmente tóxicas hacia niveles tróficos superiores, lo cual podría afectar a los seres humanos.

- *Calidad de las aguas:*

Los cambios en los volúmenes y afluentes pueden afectar directamente la calidad de las aguas. Además, las descargas de contaminantes a lo largo de la costa del estuario o dentro del estuario pueden afectar la calidad del agua y el funcionamiento del ecosistema.

La contaminación del agua se puede presentar de dos formas: fuente puntal, que corresponden a las descargas fácilmente identificables de una fábrica, mina o de alguna planta de tratamiento de aguas servidas y la fuente difusa 'no puntual' que se acumulan como resultado de las prácticas agrícolas, escorrentía urbana y el transporte de la atmosfera, este tipo de fuente es mucho más difícil de regular y controlar.

3. Agua residual de origen industrial , agrícola y ganadero:

- *Agua residual de origen industrial*

Las sustancias de las aguas residuales industriales provienen de las actividades industriales (materias primas, productos de transformación y acabados, transmisión de calor y frío). El contenido de sustancias es similar a los vertidos de origen domestico, pueden aparecer elementos propios de la actividad industrial, tales como tóxicos, iones metálicos, productos químicos, detergentes, pesticidas, hidrocarburos, compuestos orgánicos (papel, celulosa, textil, etc.) e inorgánicos (cementos) (White, 1999).

Los desechos industriales contienen además cantidades altas de materia orgánica proveniente de las plantas procesadoras de alimentos, bebida, cuero y madera. Otras actividades aumentan la descarga de sedimentos como los relaves mineros. (Escobar et al., 2002).

Numerosas son las sustancias orgánicas e inorgánicas procedentes de la actividad industrial. De forma resumida:

- Ácidos, que pueden atacar al material o inhibir los procesos.
- Básicos, que pueden inhibir los procesos biológicos.
- Productos petrolíferos y grasas poco degradables.
- Detergentes que retardan la sedimentación, forman espumas e impiden la reaireación.
- Metales pesados (Cu, Cr, Cd, Hg, etc.),
- Fenoles, cianuros inhibidores y tóxicos.
- Productos radioactivos.

- *Agua residual de origen agrícola y ganadera:*

Las sustancias procedentes de las actividades agrícolas y ganaderas son fundamentalmente: pesticidas, herbicidas, fertilizantes y residuos varios (Escobar et al., 2002; Ali y Kumar, 2008).

La eliminación de los contaminantes que se incorporan en el suelo depende de la intensidad de la lluvia, escorrentía, partículas del suelo y de la absorción por las plantas. La mayoría de los productos utilizados, son tóxicos para el hombre, el ganado, y en general para la flora y fauna. (Ghisi et al., 2010; Menéndez, 2010). Un ejemplo claro, es el uso de Endosulfan un pesticida organoclorado con una alta toxicidad, fácilmente bioacumulables en peces afectando al sistema nervioso central, reproductivo e inmunológico (Castañe, 2003).

4. Metales pesados

La contaminación de los ambientes acuáticos con sustancias potencialmente nocivas, en particular los metales pesados no degradables y su consiguiente impacto sobre los organismos es dramática porque una vez emitidos pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años especialmente cuando están cerca de zonas densamente pobladas o industriales (Marcovecchio , 2004) .

Los metales pesados forman uniones químicas con las partículas del sedimento, pasan de la columna de agua a los sedimentos de fondo para ser acumulados y posteriormente liberados, generalmente en formas más tóxicas o viables de ser tomados con mayor rapidez por los organismos marinos (Escobar et al., 2002). Su concentración en los seres humanos aumenta a medida que son ingeridos por otros, por lo que la ingesta de plantas o animales contaminados provocan síntomas de intoxicación (Navarro-Aviñó, 2007; Afaf, 2009). El contenido de estos metales en el ambiente se ve incrementada por la actividad humana, siendo sin duda la causa más frecuente de las concentraciones tóxicas (Castañe et al., 2003).

Los metales no sólo deterioran el equilibrio fisicoquímico del cuerpo acuático, si no también perturban las cadenas alimenticias dando lugar a cambios morfológicos, fisiológicos y citogenéticos en habitantes acuáticos. Estudios genotóxicos en los organismos acuáticos expuestos a aguas contaminadas con metales pesados han implicado daños en el ADN (Scalon et al., 2010).

La exposición a metales pesados, por encima de una concentración umbral, puede ser extremadamente tóxica, el problema radica en los posibles efectos a largo plazo que se pueden originar (Castañe et al., 2003; Fent, 2003; Navarro-Aviñó et al., 2007). Los metales de mayor importancia toxicológica y ecotoxicológica en los ambientes acuáticos son:

- *Plomo (Pb):*

El plomo es el metal con propiedades tóxicas que más se ha propagado en el ambiente en las últimas décadas (Navarro-Aviñó et al., 2007). Se caracteriza por unirse frecuentemente a las partículas en suspensión y a los sedimentos. El destino del plomo en los suelos y sedimentos se ve afectado por procesos similares que a menudo llevan a la formación de complejos metálicos orgánicos relativamente estables. Una parte muy pequeña del plomo se transporta a las aguas superficiales ya que la mayor parte queda retenida en los sedimentos. Así mismo, el plomo puede descender por lixiviación del suelo a las aguas subterráneas (Labunska, 2000).

Los animales pueden absorber plomo por inhalación o ingestión. Si la absorción es lenta, la excreción lo es aún más, de manera que el plomo tiende a acumularse. La anemia es el primer síntoma de envenenamiento crónico producido por el plomo en los animales, dado que interfiere en la síntesis del grupo hemo, reflejándose en síntomas tales como náuseas, vómitos y dolores abdominales. Más grave es la degeneración del tejido en el sistema nervioso central. El Pb suele aprovechar la metabolización del Ca para sustituirlo y dañar a la célula (Navarro-Aviñó et al., 2007).

Concentraciones de metales pesados en animales acuáticos (peces de agua dulce y agua salada, así como moluscos y ostras) y sedimentos fueron estudiados en Bangladesh, el estudio indicó que el plomo está altamente concentrado en los peces. Indicando que el plomo es aneugénico, clastogénico y en algunos casos mutagénicos (Kawser, 2011).

Ferrano et al., 2004 han indicado que los contaminantes frecuentes de las aguas marinas son el plomo inorgánico (Pb II) y los compuestos orgánicos del estaño. El plomo orgánico e inorgánico entra al ambiente de varios modos y puede tener diversos efectos en el organismo, incluso en elementos esenciales con efecto en enzimas que tienen grupos -SH. Además estudios han revelado que el plomo se bioacumula en altas concentraciones en los órganos de los peces debido a su capacidad de formar quelatos estables (Al-Yousuf, 1999).

- *Cobre (Cu):*

El cobre posee una alta afinidad por las sustancias orgánicas e inorgánicas, además puede existir como iones solubles y complejos, los que pueden inducir a la formación de especies reactivas de oxígeno que pueden dañar biomoléculas tales como lípidos, proteínas y DNA (Fideli, 2010). El cobre en forma soluble es mucho más propenso de migrar en el medio ambiente, siendo mucho más biodisponible que si estuviera asociado a materia orgánica.

El cobre es esencial para tener una buena salud, altas dosis o exposiciones a largo plazo pueden ser dañinas (Fedeli et al., 2010). Se ha observado que altos niveles de exposición al cobre, han producido daño en el desarrollo y en la reproducción de los animales. La toxicidad acuática del cobre reduce la supervivencia, crecimiento y fertilidad de ciertos invertebrados y produce una mayor sensibilidad embrionaria en peces. Además se ha observado un alto daño en el ADN en peces, al estar expuestos a altas concentraciones de Cu (Egito, 2010).

Carrquiriborde & Ronco, 2008 indican que el cobre posee una alta tasa de acumulación hepática, indicando además que penetra fácilmente por el cuerpo acumulándose en cantidades 20 veces mayor que el Cd.

- *Zinc (Zn):*

El zinc principalmente se encuentra adsorbido en el suelo, mientras que en el ambiente acuático se asocia principalmente con la materia en suspensión antes de acumularse en el sedimento. Sin embargo, su biodisponibilidad es posible bajo ciertas condiciones fisicoquímicas, pudiendo resolubilizarse en la fase acuosa. El Zinc al igual que los otros metales pesados es dañino en altas concentraciones, especialmente después de una exposición prolongada (Labunska et al., 2000).

4.1 Factores que afectan su acumulación y disponibilidad:

- *pH:*

La adsorción y la solubilidad de los metales pesados están condicionados por el pH del suelo, la mayoría de los metales tienden a estar más disponibles a pH ácido. El pH es importante para definir la movilidad del catión, ya que en medios con pH altos se produce precipitación como hidróxidos, disminuyendo la toxicidad. En medio alcalinos pasan a solución como hidroxicomplejos (Fent et al., 2003).

- *Dureza del agua:*

Cuando la dureza es elevada en el agua existe una baja toxicidad, porque se forman carbonatos insolubles, adsorbiéndose los metales en el carbonato, disminuyendo de esta forma la biodisponibilidad de los metales. Ejemplo de los principales cationes productores de dureza son el calcio y el magnesio quienes compiten con los metales (Mora y Alfaro, 1999).

- *Materia orgánica:*

La materia orgánica reacciona con los metales formando complejos o quelatos. Cuando los metales forman los quelatos o complejos pueden migrar con mayor facilidad y reducir la concentración de otros iones tóxicos en la solución del suelo (Fent et al., 2003).

- *Salinidad:*

El aumento de la salinidad puede incrementar la movilización de los metales y su retención por dos mecanismos: En la primera fase, los cationes Na y K pueden reemplazar a los metales en lugares de intercambio catiónico. En una segunda fase, los aniones cloruro y sulfato pueden formar compuestos más estables con metales como Zn, Cu, Cd, Pb. Por otra parte cuando la salinidad es alta el pH es alcalino.

- *Conductividad Eléctrica:*

La conductividad eléctrica es la capacidad que tiene un cuerpo de permitir el paso de la corriente eléctrica a través de sí, varía con la temperatura. La medida de la conductividad eléctrica de las aguas naturales o de los extractos obtenidos de los suelos permite establecer una estimación aproximadamente cuantitativa de la cantidad de sales que contienen (Calderon y Pavlova, 1999).

4.2 Dinámica de los metales pesados:

Los metales pesados pueden:

- Quedar retenidos ya sea disueltos en la solución del suelo o bien fijados por procesos de adsorción, complicación y precipitación. Movilizarse en las aguas superficiales o subterráneas. Ser absorbidos por las plantas y así incorporarse a las cadenas tróficas. Ser transferidos a la atmosfera por volatilización (Navarro-Aviñó et al., 2007).
- Reducir la población de los organismos que no pueden tolerar las cargas de contaminantes (*Calvo de Anta, 1997*).
- Implicar daño en el ADN (Scalon et al., 2010; Kawser, et al 2011). La unión de metales conduce efectos adversos, donde las respuestas tóxicas pueden ser debidas a alguno de los siguientes daños causados por el metal:
 - Bloqueo de grupos funcionales, biológicamente esenciales de biomoléculas. Desplazamiento de iones metálicos esenciales en biomoléculas. Modificación de la conformación activa de las biomoléculas (Castañe et al., 2003).
 - La acción genérica sobre proteínas por inhibición de la actividad o por disrupción en la estructura de las mismas.
 - Producción de radicales libres que provocan fenómenos de estrés oxidativo (Navarro-Aviñó et al., 2007).

5. *Mugil cephalus (Pez Lisa)* :

El pez lisa es miembro de la familia *Mugilidae*, corresponde a un grupo de peces con una distribución geográfica muy amplia, donde juegan un papel ecológico importante y por lo general son de apoyo a la pesca. *Mugil cephalus lisa* es una de sus especies, posee una longitud que va de los 15 a 30 centímetros y se caracteriza por encontrarse en todos los océanos (De Silva, 1980).

El pez lisa es un indicador perfecto del medio ambiente, al ser graso tiene la capacidad de acumular metales pesados y otros contaminantes en cantidades mayores que los no grasos. (Afaf et al., 2009).

En los últimos años, *Mugil cephalus lisa* se ha utilizado con fines científicos debido a su potencial como especies cultivables en los trópicos.

- *Distribución:*

Localidad tipo: Entrada de ríos, océanos europeos y en Chile desde la I a la XI región.

En la V región destacan las zonas del estero de Reñaca, estero de Limache, río Aconcagua, Maitencillo, Ventanas, Mantagua, estero Yali y río Maipo (Quiroz et al., 2009).

Los peces *lisas* son catadromas es decir, peces que viven en agua dulce y se reproducen en agua de mar. Las especies juveniles de *lisa* después de la metamorfosis y un corto período de crecimiento tienden a moverse en las aguas costeras de bajura, principalmente en lagunas y estuarios. (De Silva et al., 1980).

- *Hábitos Alimenticios:*

Se le confieren hábitos planctofagos y también se le ubica entre los filtradores de fito y zooplancton. Ruiz (1993) plantea que más bien serían iliófagos, alimentándose de los componentes del fango, micro y meioinfauna (Quiroz & Moreno, 2009).

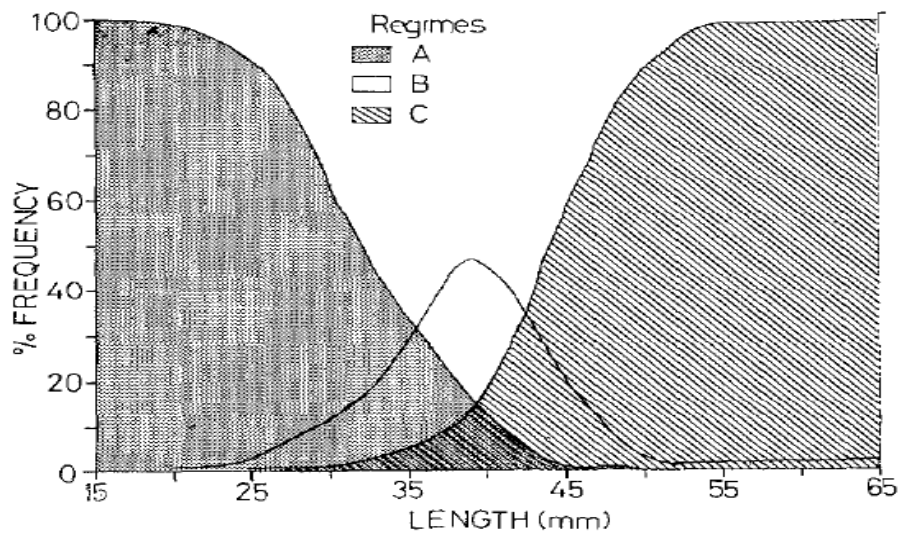


Figura 1: Refleja los cambios en la composición de la dieta de *Mugilidae* juveniles a medida que aumenta el tamaño. (Régimen A, carnívoros; B, herbívoros; C, mixto) Albertini-Berhaut (1974).

- *Efectos de la salinidad:*

Prospera en una amplia gama de salinidades 0-113 aunque siempre desovan en el mar. Gracias a su eurihalinidad a menudo los encontramos en lagunas costeras salobres para mejorar la producción de los peces y en estuarios de agua dulces para mejorar la calidad del agua (De Silva et al., 1980).

6. *Odontesthes brevianalis* : (**Cauque**)

La morfología de estos peces es fusiforme, con 60 a 80 escamas en la línea lateral y 18 a 22 en línea transversal. Boca terminal, pequeña, libremente protráctil, sin dientes en el palatino; con dientes en las mandíbulas, en dos series irregulares. Poseen banda lateral plateada, su ancho menos que la mitad de la longitud del ojo, con margen superior oscuro (Ruiz y Marchant, 2004).

- *Distribución:*

Es una especie predominantemente estuarina, muchas veces se encuentra en las zonas bajas de los ríos. El rango de distribución de *Odontesthes brevianalis* se extiende desde la Serena (29°54', 71°15') hasta Puerto Montt (41°28', 72°56'). En la Laguna de Conchalí (31°53'; 71°32'). Los Vilos, y IV Región (Vargas, C. 2002). La distribución de esta especie también está descrita en la IV y V y desde la VI a la X Regiones (Campos et al, 1998) y en los estuarios de la Serena a Chiloé (Dyer, B. 2000). Otras localidades que han sido mencionadas para este ejemplar son Estero Quintero (V Región) (De la Hoz y Vial, 1994).

- *Reproducción:*

El período de reproducción de *O. brevianalis* está mencionado en primavera y verano y madura al primer año de edad, factor que explicaría la menor tasa de crecimiento encontrado en las hembras.

- *Habitad:*

Esta especie es considerada haloeurialina, pudiendo habitar las regiones de aguas salobres, también se describen como peces bentopelágicos de aguas templadas y se pueden encontrar en lagunas costeras con variabilidad temporal en las características físico-químicas y con influencia de aportes fluviales y marinos, lo que implicaría adaptaciones a estos ambientes.

Sus áreas de desove se encuentran en la zona de afluencia límnic, mientras que los jóvenes y adultos habitan casi exclusivamente en agua salobre.

- *Vulnerabilidad*

Dado que, se acuerda que ha habido una reducción del 32,9 % según índices de densidad registrados y también habría una reducción en su área de ocupación (Campos et al., 1998). La calidad de su hábitat se está reduciendo por contaminación, fragmentación y la introducción de especies piscícolas exóticas.

- *Principales amenazas actuales y potenciales*

O. brevianalis es vulnerable a la depredación por especies introducidas. Su hábitat es alterado por artificianción debido a la canalización de ríos. En la zona norte y central existe una alta demanda por el agua en sus diversos usos, por tal motivo se intervienen los sistemas fluviales, modificando el hábitat de las especies y principalmente la alimentación de los peces.

7. ¿Por qué estudiar el efecto genotóxico de sustancias contaminantes en peces?

Los estudios sobre la fauna de peces centinelas chilenos han tenido un fuerte incremento en las dos últimas décadas (Zunino et al., 2004), aquellos relacionados con las desembocaduras de la Región de Valparaíso aun son escasos. En general, los estuarios están potencialmente expuestos a los contaminantes químicos, transportados por los ríos de las zonas urbanas e industriales. De hecho se ha convertido en el principal reservorio de una gran cantidad de sustancias químicas introducidas en el ecosistema acuático por las actividades humanas. Como resultado para determinar la presencia o riesgos potenciales de daño al ADN, se utilizan marcadores para los organismos y las respuestas para los análisis a los sub-organismos que se establezcan para estos ecosistemas (Andrade et al., 2004; Scalón et al., 2010; Laxmi et al., 2011).

Chile posee un gran número de estuarios con ambientes diferentes, algunos se encuentran en zonas con alta densidad demográfica y de importantes actividades productivas, mientras que otros reciben la presión antropogénica en función de la intensidad y tipo de actividad económica cercana (Díaz-Jamarillo et al., 2010).

Las especies más comunes y abundantes dentro de las desembocaduras de los ríos de la Región de Valparaíso son *Odontesthes brevianalis* y *Mugil cephalus* (Zunino et al., 2004). En la práctica la utilización de peces como indicador biológico es cada vez más empleada, debido a que son particularmente sensibles a los contaminantes genotóxicos especialmente con los metales quienes interactúan con el ADN, son especies altamente disponibles, accesibles y fáciles de manipular (Buschman & Fortt et al., 2010; Egito et al., 2010; Ahmed et al., 2011; Mohanty et al., 2011). A largo plazo estos estudios pueden constituir un elemento importante para determinar la capacidad de reparación del ADN y explorar la respuesta de tejidos específicos frente a determinados contaminantes (Sharma, 2007; Mohanty et al., 2011).

La estimación de las primeras señales de peligro utilizando biomarcadores en un ecosistema proporciona información útil para el biomonitoreo ambiental y permite el desarrollo de estrategias de control y medidas de prevención (Mitchellmore et al., 1998; Fent et al., 2003; Simoniello et al., 2009).

8. Biomarcador

- *¿Qué es un biomarcador?*

Un biomarcador puede ser definido como un indicador de eventos celulares y moleculares en sistemas biológicos, en poblaciones provenientes tanto de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes, que indican la exposición y la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante (Fent et al., 2003; Dusinska y Collins, 2008). Se consideran biomarcadores a las medidas realizadas en los niveles molecular y celular de organización biológica, porque es en estos niveles donde ocurre la interacción inicial de los contaminantes con los organismos y en base a los cuales podremos desarrollar medidas sensibles que sirvan como señales de alerta temprana de efectos en los niveles superiores de individuo, población o ecosistema.

Este nivel de organización es además el ideal para estudiar relaciones causa-efecto y los mecanismos de acción de los contaminantes (Castañe et al., 2003). Los biomarcadores pueden ser utilizados para monitorear los niveles de exposición a agentes causantes de enfermedades, determinar las consecuencias biológicas de la exposición, identificar a los individuos sensibles de una población, fundamentar la decisión de intervenir tanto a nivel individual como ambiental.

La ventaja principal del uso de biomarcadores es que considera las variaciones interindividuales (mecanismos de reparación, biodisponibilidad, excreción) e incluso intraindividuales como consecuencia de una alteración fisiopatológica concreta en un periodo determinado de tiempo, además nos proporciona información útil ya que puede definir un estado de prepatogénesis, previniendo posibles y futuras enfermedades.

Un biomarcador ideal debe reunir las siguientes características:

- Alta especificidad para el efecto de interés. Ser reflejo de un efecto temprano.
- Su análisis debe ser fácil y de bajo costo.
- Factibilidad de realización con muestras tomadas de forma no invasivas.
- Bajo nivel de interferencia con el flujo biológico de interés.
- Correlación entre los niveles de exposición y la respuesta del biomarcador.
- Debe existir correlación entre la magnitud de daño y la respuesta del biomarcador (Martínez, 2007).

- Tipos de biomarcadores:

- *Biomarcador de exposición:*

Se caracterizan por detectar algún compuesto exógeno dentro del organismo que refleja la exposición de este a un xenobiotico. Es decir, determina si el agente genotóxico ha penetrado en el organismo y si el compuesto que penetra e interactúa con el material genético produce aductos en proteínas y en el ADN. Principalmente, el análisis se realiza en fluidos corporales (sangre, orina, aire espirado) Larrea, 2007.

- *Biomarcador de efecto:*

Este tipo de biomarcador es el más utilizado en el estudio de biomonitorización humana, miden el daño genético una vez que ya ha sido procesado por el organismo. Como los efectos se fijan reflejan daño acumulativo, es decir reflejan daño correspondiente a exposiciones pasadas (Saleha et al., 2001).

Biomarcador de daño sobre el ADN:

Mucho de los metabolitos reactivos originados a partir de compuestos orgánicos, forman aductos en proteínas y ADN, los que pueden ser empleados como marcadores del daño derivado de la exposición a xenobióticos que originan un incremento en el desarrollo de procesos carcinogénicos (Walker, 1996; Meyer, 1996; Shugart, 1996).

Algunos de los tóxicos capaces de formar aductos en el ADN, son los hidrocarburos aromáticos policíclicos, metales pesados entre otras sustancias (Poirier, 1996; Poirier, 1997).

- *Biomarcador de susceptibilidad:*

Sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos. Esto se puede deber a que tienen más activos los procesos de bioactivación o a que tienen disminuidas sus capacidades de detoxificar, excretar o de reparar daños, por tanto aquellos individuos que posean deficientes mecanismos de reparación presentaran mayor nivel de daño genético frente a aquellos que presentan mejor capacidad de reparación al daño genético (Larrea et al., 2007).

- Importancia de los biomarcadores

La validación, optimización y especificidad de los biomarcadores, debe ser objetivo clave para detectar el impacto de la contaminación sobre la estabilidad de los ecosistemas normalmente en combinación con la evaluación de la calidad del medio. Por esta razón uno de los objetivos de este trabajo es utilizar el ensayo del cometa como biomarcador de exposición genotóxica en peces.

El material genético es susceptible a ser dañado por numerosos agentes o procesos, los que incluyen factores ambientales, nutricionales, agentes químicos, entre otros (Mitchelmore et al., 1998).

Aunque la mayoría del daño que se produce en el ADN es reparado por una eficiente maquinaria enzimática parte de él escapa de este proceso constituyendo uno de los sustratos para el potencial desarrollo de un proceso carcinogénico, teratogénico, clastogénico o mutagénico. Estas lesiones no reparadas o mal reparadas pueden afectar los diferentes mecanismos tales como el control del ciclo celular, la expresión génica y la comunicación citoplasma-mitocondria, entre otros (Zúñiga, 2009). Razón por la que surgió la necesidad de contar con herramientas sensibles, rápidas y fiables que nos permitan detectar el daño en el ADN (Koppen & Verschaeve 1996; Navarrete, 1997; Belpaeme et al., 1998; Rajaguru et al., 2003; Shet, 2008; Liman, 2011; Mohanty et al., 2011; Zhang, 2011). En los últimos treinta años se han desarrollado métodos para detectar daños en el material genético, siendo el más utilizado el ensayo realizado en electroforesis de geles con células únicas (SCGE), que permite evaluar roturas de cadena simple (SSB) y de doble cadena (DSB) en el ADN (Koppen et al., 1996; Andrade et al., 2004, Nossoni, 2008; Liman et al., 2011; Mohanty et al., 2011).

El ensayo del cometa ha tenido un gran impacto en las diferentes áreas, siendo utilizado en campos que van desde la epidemiología molecular a la toxicología genética (Zhang et al., 2011). Actualmente el uso del ensayo del cometa sigue desarrollándose continuamente.

9. Ensayo del cometa : Desarrollo histórico

En la década del 1976, Cook publicó un artículo que se basaba en la lisis de células utilizando detergentes no iónicos y una alta molaridad de cloruro de sodio. El tratamiento eliminaba las membranas, citoplasma y nucleoplasma. Las histonas se solubilizaron con la solución de lisis, por lo que los nucleosomas se desorganizaron, resultando un material que denominaron nucleoide o matriz nuclear, compuesta por ADN, RNA y proteínas.

La estabilidad del superenrollamiento del ADN, implica que la rotación de la doble hélice de la molécula no es posible si no posee un punto de apoyo, por lo tanto se propuso un modelo en el cual las dobles cadenas libres del ADN deberían estar ancladas en diferentes puntos de esta matriz ribonucleoproteica (Denominada en la actualidad “Scaffold ”) y organizándose en una serie de lazos a modo de “Loops ”. Cuando los nucleoides fueron sometidos a la acción de un agente intercalante (bromuro de etidio), se relajó el superenrollamiento expandiéndose los lazos de ADN fuera del nucleoide, formándose un halo alrededor del mismo (Collins, 2004; Piperakis, 2008).

Efectos similares se observaron cuando se utilizó la radiación ionizante, para relajar los lazos. Rydberg y Johanson (1978) describieron un método para el análisis de células individuales basado en la lisis alcalina de las células previamente irradiadas.

Ostling y Johanson (1984) utilizaron microgeles de electroforesis empleando un pH menor a 10. Las células embebidas en agarosa fueron lisadas con detergentes y concentraciones de sal para la formación de los cometas, posteriormente al ser sometidos a un campo eléctrico, se produjo la migración de los fragmentos de ADN que habían sido expulsados por el nucleoide. La migración de las moléculas de ADN, cargadas negativamente, desde el nucleoide hacia el ánodo permitió, el incremento de la sensibilidad en la detección del daño. El ensayo detecta roturas de cadena doble (DSB), que resultan de fragmentos de ADN que pudieron ser detectados sometiéndolos a la electroforesis a pH neutro.

Este ensayo más tarde fue modificado, Singh (1988) describió una versión del ensayo en la que aumentaron el pH de la electroforesis (pH > 13), permitiendo que al ADN desenrollarse y relajarse de esta manera hace posible la detección de SSB, sitios alcalilábiles (ALS) y SSB asociados a la reparación incompleta por escisión (Mitchelmore et al., 1998; Sharma et al., 2007; Piperakis et al., 2008). Esta versión del ensayo entrego un notable incremento de la sensibilidad para identificar agentes genotóxicos. Es en este trabajo en donde se le denomina a la técnica como 'Electroforesis en gel de células individualizadas' (*SCGE – Single cell gel Electrophoresis*) o también conocido como ensayo del cometa. La técnica alcalina es la que ha sido utilizada por la mayoría de los laboratorios debido a su sensibilidad frente a la versión neutra de Olive que solo detecta daño en dobles hebras (DSB).

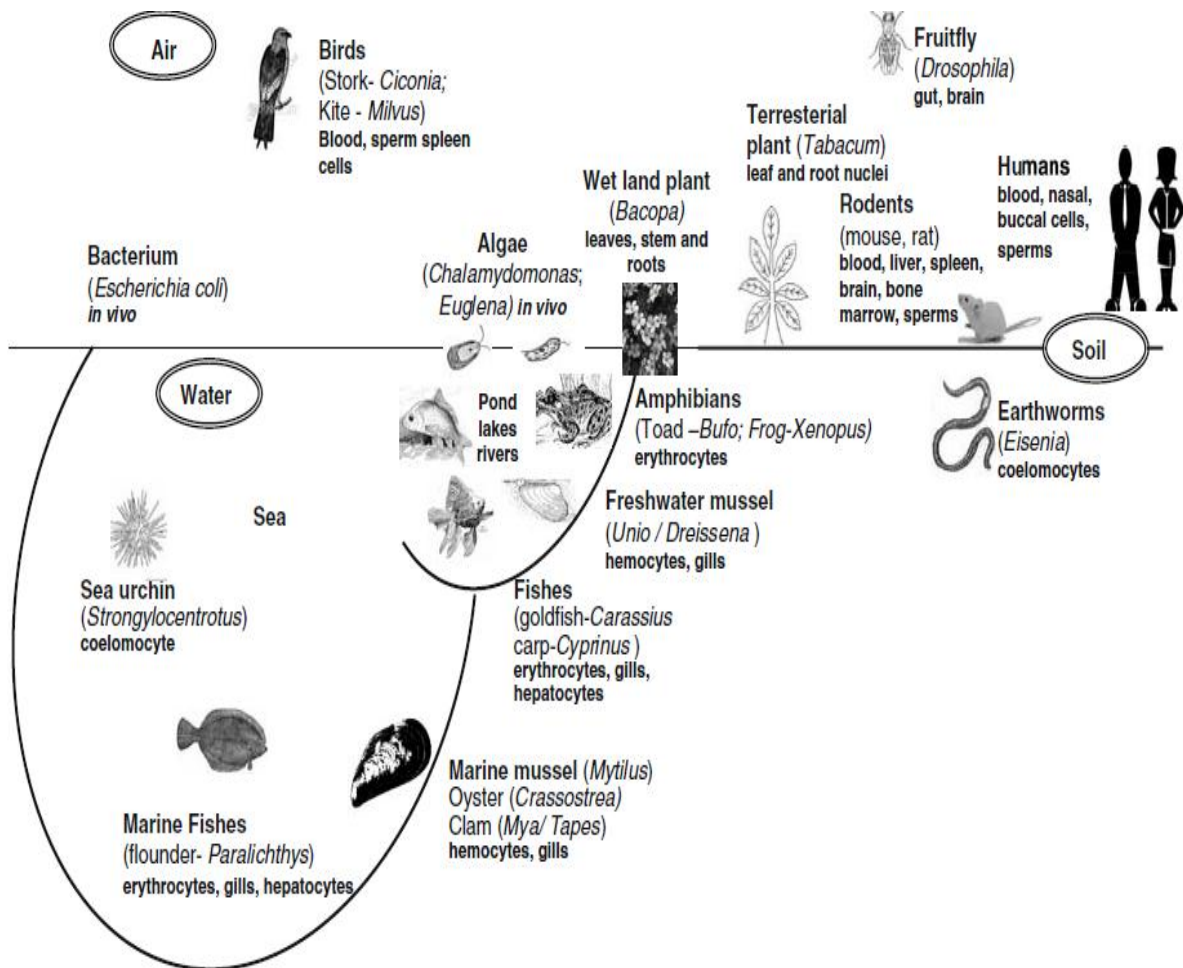
Una de las modificaciones que ha sido adoptada en los últimos años ha sido la utilización de enzimas de reparación específicas, las cuales detectan un amplio rango de lesiones en el ADN (Collins, 1993; Dusinská y Collins, 1996; Mitchelmore et al., 1998; Piperakis, et al 2008; Nossoni et al., 2008). En principio, cualquier lesión que tenga su enzima para ser reparada puede ser detectada utilizando este método. Así es posible detectar pirimidinas oxidadas utilizando endonucleasas III (EndoIII); purinas alteradas como 8-hidroxiguanina (8-OHG) mediante digestión de formamidopirimidina-DNA glicosilasa (FPG), dímeros de timina producido por radiaciones UV mediante el uso de endonucleasa T4, por lo general todas estas enzimas reconocen un sitio particular de daño y crean rupturas (Collins et al., 2004). El ensayo del cometa también permite medir niveles de reparación del ADN tratando las células con algún agente genotóxico, incubándolas y luego aplicándole el ensayo para detectar la eliminación de daños (Shaposhnikov, 2009).

Otra modificación de la técnica ha sido el uso del ensayo del cometa junto con la técnica de hibridación in situ fluorescente (COMET-FISH) con sondas marcadas con secuencias particulares de ADN que permiten reconocer el sitio de interés, la identificación de enlaces cruzados ADN-ADN y la localización de daño en genes específicos, donde los daños y la reparación del ADN pueden examinarse en un nivel aún más preciso (Anderson, 1997a; Santos, 1997; Shaposhnikov et al., 2009).

10. Aplicaciones:

Dada las ventajas que posee el ensayo del cometa, existe una amplia gama de aplicaciones, empleándose en distintos modelos biológicos tanto in vivo como in vitro (Collins et al., 2004).

La **figura 2** muestra un esquema de la aplicación del ensayo del cometa en modelos que van desde bacterias a humanos (Dhawan, 2008)



- *Pruebas de genotoxicidad:*

El ensayo del cometa es utilizado como una prueba para evaluar la seguridad de productos químicos y farmacéuticos, además de ser adecuado para evaluar la capacidad de los fotoquímicos para proteger por ejemplo, las células contra el daño genotóxico. El único requisito es obtener una cantidad suficiente de células para aplicar el ensayo, sin la introducción de daño adicional (Piperakis et al., 2008).

- *Monitoreo ecológico:*

El impacto de sustancias tóxicas en la integridad y el funcionamiento del ADN celular se han investigado en un gran número de organismos bajo condiciones ambientales. Las roturas en las cadenas de ADN reflejan la exposición a contaminantes ambientales de una manera rápida y sensible (Machado, 2009; Mohanty et al., 2011). Organismos adecuados se utilizan como biosensores de la contaminación del medio ambiente (Piperakis et al., 2008). Por lo general se trabaja con organismos que vivan cerca de los sitios de desechos ya que se ha demostrado que tienen elevados niveles de daño en el ADN en comparación con animales que viven en lugares sin o con menor contaminación. La localización y la determinación de las concentraciones de contaminantes pueden asegurar la vida de estas especies y del medio ambiente.

- *Biomonitoreo:*

Se utiliza como método para controlar la exposición ocupacional a sustancias químicas, radioterapia, evaluación del estrés oxidativo asociado a enfermedades, detección de daño en el ADN asociadas con el tabaquismo. Por lo general, se observa una variabilidad de respuesta entre organismos expuestos con el control como consecuencia de los cambios en la dieta, estrés, lugar, infecciones.

- *Análisis nutricional:*

El ensayo del cometa es ideal para investigar el daño del ADN causado por los nutrientes o micronutrientes. Por lo general se ha observado que las dietas que difieren en el contenido de lípidos aparentemente provocan un aumento en el daño oxidativo al ADN, por otro lado el uso de suplementos o alimentos antioxidantes disminuyen la oxidación o la sensibilidad al daño causado por H₂O₂ (Collins et al., 2004).

- *Evaluación de daño oxidativo:*

El daño al ADN producto de radicales libres es un posible factor en la etiología del cáncer. Es por ello que mediante el uso de enzimas específicas se puede detectar por ejemplo la presencia de 8-oxoguanina (Collins et al., 1993; Dusinská et al., 1996; Mitchelmore et al., 1998; Piperakis, et al 2008; Nossoni et al., 2008)

- *Medición de la reparación del ADN:*

Para medir la capacidad de reparación se les proporciona daño a las células, midiendo la cinética con la que se retienen las lesiones. Así las células pueden ser tratadas con distintos agentes químicos, radiaciones ionizantes o H₂O₂ y analizadas mediante el uso de enzimas que detectan según sea el caso, purinas y pirimidinas oxidadas, dímeros de pirimidina entre otros.

11. Ventajas y limitaciones:

Una técnica de evaluación del daño del ADN debe ser rápida, sensible (Machado et al., 2009; Mohanty et al., 2011; Zhang et al., 2011) y aplicable en diversas poblaciones celulares. (Nossori et al., 2008; Egito et al., 2010; Mohanty et al., 2011).

El ensayo del cometa evalúa el daño del ADN en una variedad de células dañadas por distintos agentes tanto químicos como físicos. Permite establecer relaciones dosis-respuesta a bajas dosis, es decir niveles bajos de daño con respecto a otras técnicas ecotoxicológicas como el ensayo de micronúcleos (MN), el ensayo del cometa ha demostrado una gran sensibilidad detectando entre 50 y 15.000 roturas por célula (Rajaguru et al., 2003; Piperakis et al., 2008; Piperakis, 2009).

El ensayo es capaz de detectar una amplia variedad de lesiones en el ADN roturas en hebras simples, dobles, transitorias de reparación y enlaces cruzados (Ghisi et al., 2010; Mohanty et al., 2011; Zhang et al., 2011).

El hecho de que el ensayo del cometa tenga la capacidad de detectar daño en células individualizadas y que puedan ser aplicables en diferentes tejidos, constituye una de las principales ventajas del ensayo (Lovell y Omori, 2008; Tolga Cavas y Serpil Könen, 2008; Fedeli et al., 2010; Ghisi et al., 2010). El obtener los datos a nivel individual puede aportar información sobre la heterogenidad de una muestra. Así, el ensayo del cometa permite detectar diferencias intercelulares tanto de la respuesta al daño como de su reparación. Además, se requiere un bajo número de células para realizar el ensayo (<10000) (Rajaguru et al., 2003; Kumaravel et al., 2007).

Se puede utilizar cualquier tipo de células, tanto procariotas como eucariotas Además, en términos de biomonitorización humana, se puede aplicar el ensayo a células que son el primer sitio de contacto con sustancias carcinogénicas/mutagénicas como células de la mucosa nasal. (Kumaravel et al., 2007; Piperakis et al., 2008; Mohanty et al., 2011).

Dentro de las variables que más afectan a la técnica se encuentran: La concentración de la agarosa y de las disoluciones, el pH, duración de la electroforesis y medición (Belpaeme et al., 1998). Un factor limitante del ensayo es que no detecta efectos aneugénico (cambio en el número de cromosomas), los cuales pueden ser eventos claves en el desarrollo de un proceso de carcinogénesis (COM, 2000).

El ensayo del cometa no es capaz de detectar fragmentos pequeños de ADN (menores a 50 Kb), ya que en su mayoría son removidos durante la lisis y la electroforesis. (Nossoni et al., 2008). Otra desventaja es contar células que se encuentran aglomeradas en una determinada área de la muestra, aumentando la probabilidad de sesgo y por tanto la variabilidad entre los observadores (Belpaeme et al., 1998).

Una de las limitaciones más relevantes del ensayo radica en el desconocimiento de los principales mecanismos de formación del cometa (Darragh, 2009). A pesar de esta serie de desventajas, la técnica del cometa ha sido adoptada a nivel mundial, aumentando cada día el número de publicaciones y aplicándose en numerosas áreas (Belpaeme et al., 1998).

III. Planteamiento del Problema

Los estuarios cumplen funciones ecológicas esenciales, incluyendo la protección de la línea costera, el mejoramiento de la calidad del agua, hábitad y alimento para recursos pesqueros y otros animales residentes y migratorios. A pesar de su importancia ecológica los estuarios históricamente han sido sujetos a la industrialización y urbanización, ya que brindan excelentes oportunidades para el transporte, desarrollo, descarga y dilución natural de desechos. En estos ecosistemas, los sedimentos son importantes sumideros de una gran variedad de contaminantes, particularmente de metales pesados y también pueden servir como una fuente enriquecida para los organismos bentónicos.

Los hábitats estuarinos son comunes y poseen una alta biomasa pero relativamente baja diversidad de especies. Son áreas de alimentación y reposo para poblaciones importantes de aves vadeadoras y acuáticas y sirve como criaderos de peces. Para las especies que usan estas áreas como criaderos o zonas de alimentación, la historia previa de exposición a metales pesados puede ser importante ya que puede afectar su futura captación y bioacumulación de metales a diferentes niveles biológicos. La exposición a metales puede inducir cambios fisiológicos y bioquímicos en las células afectadas por metales traza, pudiendo afectar a todo el organismo o población. Asimismo, las sustancias tóxicas son capaces de influenciar la distribución y abundancia de especies (Cardoso, 2008).

En Chile, existe escasa información del real impacto que han producido estas actividades en los ecosistemas lóticos (Buschmann & Fortt et al., 2005), especialmente en relación a la distribución, disponibilidad y efectos de los metales pesados en *Odontesthes brevianalis* y *Mugil cephalus lisa*, en la desembocadura en ríos de la región de Valparaíso.

El cauque, es una especie predominantemente estuarial (Dyer et al., 2000) y el pez *lisa*, es una especie que se encuentra principalmente en los estuarios tropicales y templados. En nuestra región presente en las desembocaduras de los ríos.

Diversos estudios han indicado que los metales pesados son asimilados por *Mugil cephalus lisa* acumulándolos en sus tejidos (Licata et al., 2003, Afaf et al., 2009), esto está probablemente relacionado con las características iliófagas de esta especie (Marcovecchio et al., 2004). Lo que supone una vía de paso de sustancias potencialmente tóxicas hacia niveles tróficos superiores, pudiendo afectar a los seres humanos.

En la cuenca del río Aconcagua y río Maipo se desarrolla la actividad minera, así también las cuencas son reconocidas por su variedad industrial y agrícola. La convivencia de todas estas actividades genera conflictos de uso de los recursos presentes en la cuenca y la escasa legislación sobre el uso de las aguas hace de mayor interés llevar a cabo estudios que determinen el potencial tóxico de estos.

Uno de los mayores problemas es que se desconoce si los niveles de concentración de agentes químicos metálicos presentes en las aguas cercanas a centros con actividad minera generan o no efecto genotóxico en la fauna asociada.

IV. Hipótesis

Entre los agentes químicos presentes en estos cuerpos de agua están los metales, provenientes de actividades mineras que se desarrollan en sus cuencas. Por ello, se postula que estas aguas provocan efectos genotóxicos en los peces.

V. Objetivo General

- Evaluar la genotoxicidad de las aguas de las desembocaduras de los ríos Aconcagua, Maipo y Catapilco en los peces *M. cephalus lisa* y *O. brevianalis*.

Objetivo Específicos

- Implementar y estandarizar la técnica del ensayo del cometa.
- Determinar la genotoxicidad de las aguas de las desembocaduras de los ríos Aconcagua, Maipo y Catapilco en *M. cephalus* y *O. brevianalis*.
- Caracterizar física y químicamente las aguas de las desembocaduras de los ríos Aconcagua, Maipo y Catapilco.
- Determinar las concentraciones de metales traza en tejido de *M. cephalus* y *O. brevianalis* colectadas en los sitios de muestreo de las desembocaduras de los ríos Aconcagua, Maipo y Catapilco.
- Correlacionar la respuesta genotóxica y las concentraciones de metales Cobre, Plomo y Zinc bioacumuladas.

VI. Materiales y Métodos

12. Estandarización de la técnica del cometa bajo las condiciones de laboratorio

Para la estandarización de la técnica bajo las condiciones de laboratorio se utilizó un control positivo, con cloruro de cobre (CuCl_2) en concentración 0,0108 (g x L). Los organismos fueron expuestos en peceras que contenían 11 Litros de agua preparada y 11 Litros de agua de la desembocadura del río Aconcagua junto al tóxico. El tiempo máximo de exposición fue de 2 horas.

Se experimentó con dos parámetros claves de la técnica, los cuales son el tiempo de exposición a la solución de lisis y los tiempos de electroforesis.

- a) 1 Hora de Lisis; 20, 30 y 40 minutos de electroforesis.
- b) 2 hora de Lisis; 20, 30 y 40 minutos de electroforesis.

Una vez determinado el tiempo óptimo de lisis y electroforesis en nuestras condiciones de laboratorio se tomaron fotografías de los distintos tipos de daño en el ADN obtenidos en condiciones reales, comparados con los esquemas obtenidos de Collins et al., 1995 los que fueron utilizados como imagen de referencia en la caracterización de daño genético para las siguientes fases.

13. Caracterización de las especies *Mugil cephalus lisa* y *Odontesthes brevianalis* :

Para este estudio se emplearon peces lisa (*Mugil cephalus lisa*) y cauques (*Odontesthes brevianalis*) de la desembocadura de los ríos Aconcagua, Maipo y del estero de Catapilco. Los lugares de muestreo se ubican en áreas cercanas a las actividades antrópicas de las cuencas a excepción de Catapilco que se emplea como control.



Figura 3: Proceso de captura de peces

Paralelamente a la extracción de las muestras biológicas (sangre y branquias) para tener un buen conocimiento de las características de las poblaciones de estudio, cada pez fue medido (cm) y pesado (g), con el fin de determinar el factor de condición (k) mediante la siguiente fórmula:

$$K = \{P \text{ (g)} / L^3 \text{ (cm)}\} \times 100$$

Donde P (g) es el peso de los individuos expresado en gramos y L^3 (cm) es la longitud cúbica de los individuos expresados en centímetros.

Además se calculó el factor de bioacumulación (FB), donde:

$$FB = \frac{[X_{\text{tejido}}]}{[Y_{\text{agua}}]}$$

X: Concentración de metal en tejido.

Y: Concentración de metal en agua

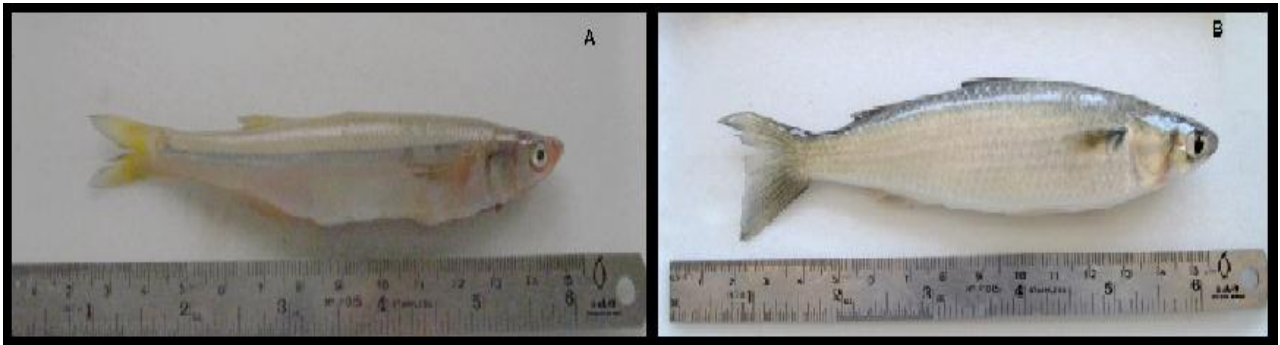
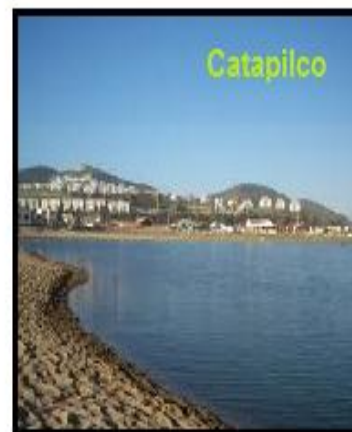
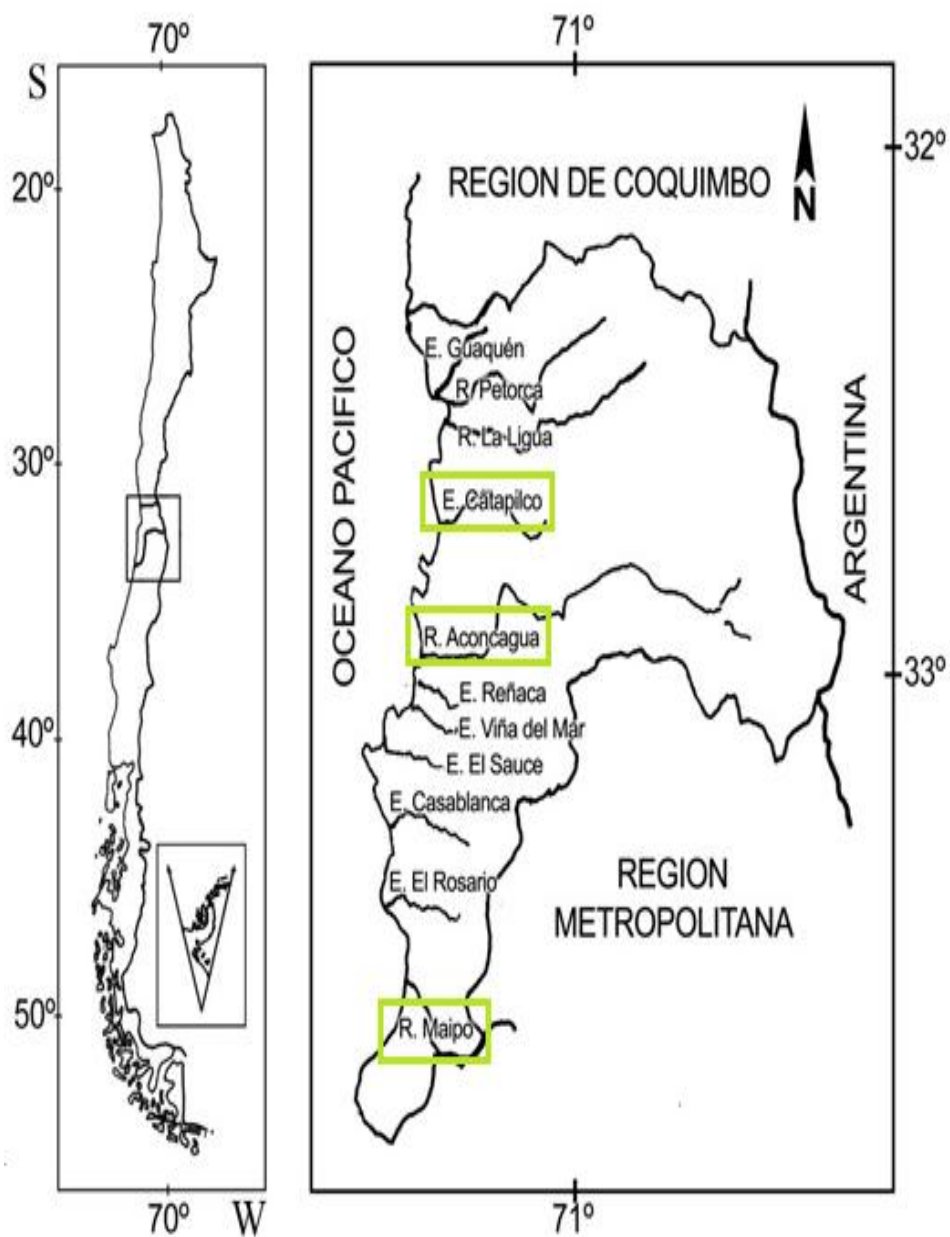


Figura 4: A) *Odontesthes brevianalis*; B) *Mugil cephalus lisa*

Figura 5: Mapa de la Región de Valparaíso donde figuran las localidades de procedencia de las poblaciones de *Mugil cephalus lisa* y *Odontesthes brevianalis* estudiadas. Población 1: Estero de Catapilco; Población 2: Río Aconcagua; Población 3: Río Maipo (Elaboración propia con imagen Google Earth 2011).



14. Determinación de las características fisicoquímicas del agua:

En cada sitio de muestreo se midió temperatura (°C), pH, conductividad eléctrica (dS/m) y sólidos disueltos (ppm).

14.1 Análisis de la muestra de agua:

Las muestras de agua se tomaron desde una botella plástica y se almacenaron a 4°C hasta su uso (Ptashynski, 2002; Rajaguru et al., 2003).

La determinación de metales en la muestra de agua fue realizada por el Laboratorio de toxicología Humana y Ambiental de la Universidad de Playa ancha.

El método utilizado para la determinación de Cu, PI y Zn en agua cruda fue (St Methods 3111 B, 21st Ed).

14.2 Determinación de metales trazas en branquias:

Los peces se mantuvieron a 4°C hasta su análisis. Posteriormente con la ayuda de pinzas y tijeras se sacaron las branquias las que fueron colocadas y rotuladas en tubos eppendorf.

El análisis de los metales esenciales (Zn y Cu) y de metales tóxicos (Pb) fue realizado por el Laboratorio de toxicología Humana y Ambiental de la Universidad de Playa ancha.

El método utilizado para la determinación de Cu fue (NCh 2638. Of 01), PI (NCh 2751. Of 3) y para el Zn (AOAC 986 15)

15. Obtención de la muestra de sangre en *Mugil cephalus lisa* y *Odontesthes brevianalis*:

La extracción de sangre se realizó por disección abdominal (desde la altura de la aleta pectoral hacia el opérculo), utilizando capilares heparinizados (Simoniello, 2009). El traslado del material biológico desde el lugar de monitoreo hasta nuestro laboratorio se realizó dentro de un par de horas a 4°C, manteniendo los tubos eppendorf previamente rotulados, en un contenedor en posición horizontal y evitando movimientos bruscos.



Figura 6: Disección del pez desde la aleta pectoral hacia el opérculo (*Odontesthes brevianalis* y *Mugil cephalus lisa*).



Figura 7: Extracción de sangre en los peces.

Una vez que las muestras llegaron al laboratorio de toxicología, se procedió a realizar la viabilidad celular y el ensayo de cometa.

15.1 Viabilidad celular:

Para determinar la viabilidad celular se utilizó el protocolo de Jha, 2005 modificado, para ello se añadió en un tubo de eppendorf 20 μ L de la muestra de sangre. A continuación se agregaron 20 μ L de *Eosina-Y* al 0, 2 % (que fue preparada con ringer y 2,5 g de *eosina-Y*). Se dejó reposar por unos segundos, la mezcla celular se colocó en un portaobjeto cubierto con un cubreobjetos.

Finalmente se contabilizaron 100 células y se registró el número de células viables y muertas (células con el interior teñidas). Las muestras que presentaron una viabilidad superior al 75 % fueron tratadas posteriormente para la evaluación del ensayo del cometa. (Ahmed et al., 2011).

El cálculo de la viabilidad se realiza de la siguiente forma:

$$\text{Viabilidad celular} = (\Sigma \text{ células viables} / \Sigma \text{ células totales}) \times 100$$



Figura 8: Observación de la viabilidad celular (40 X)

15.2 Muestra control:

Para determinar en qué estado se encontraban los eritocitos antes de iniciar el ensayo del cometa, se escogieron al azar algunas muestras de sangre, las que se colocaron sobre un portaobjetos, a continuación se agregó una gota de bromuro de etidio (10 μL) y posteriormente se colocó un cubreobjetos.

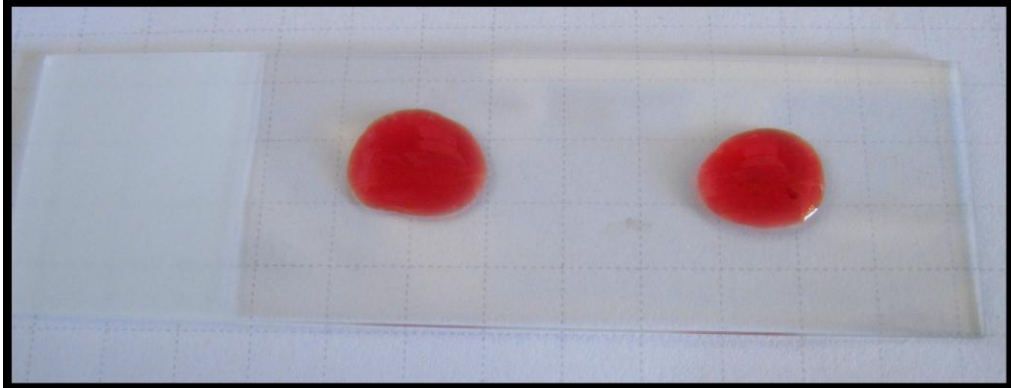


Figura 9: Muestra de sangre antes de ser teñida con bromuro de etidio.

16. Protocolo estándar:

El ensayo del cometa posee diversas versiones, sin duda la versión alcalina es la más utilizada en los laboratorios. La técnica resulta más sensible a $\text{pH} > 13$ para la detección de niveles bajos de daño, escogiéndola como versión estándar para su descripción en detalle

La versión estándar del ensayo del cometa se lleva a cabo bajo condiciones alcalinas, de acuerdo al método descrito por (Singh et al., 1988), con algunas modificaciones. Para esto se realizó una serie de etapas, tal como se describen a continuación.

16.1 Preparación de la agarosa:

- *Agarosa al 0,5 %*

Se preparo 1 % de agarosa de bajo punto de fusión (1 g) en 100 ml de agua destilada en un vaso de vidrio de 100 ml y se llevo a calentar al microondas. Se repitió 2 veces más, para un calentamiento uniforme.

Posteriormente se realizó el mismo procedimiento para la agarosa de bajo punto de fusión LMA al 0,5% (0,5 g / 100 ml)

- *Agarosa al 1%*

Se derritió la agarosa de punto de fusión normal NMA y se añadió las tres cuartas partes en el portaobjeto. A continuación fueron colocadas en una estufa ($40^{\circ} - 50^{\circ}\text{C}$) para que solidificaran y se almacenó hasta su uso.

16.2 Preparación de los microgeles de agarosa:

Para el ensayo del cometa, se utilizaron portaobjetos muy limpios y secos, para ello fueron desengrasados con metanol, posteriormente se añadió agarosa de punto de fusión normal (NMA) al 1 % en agua destilada, y se calentó hasta su ebullición. A continuación se prepararon alícuotas con 10000 células de la muestra de sangre (10 μ L), cada alícuota se mezcló con 10 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) al 1% en PBS (10 μ L). Se colocó a baño maría, manteniendo la temperatura en 37°C.

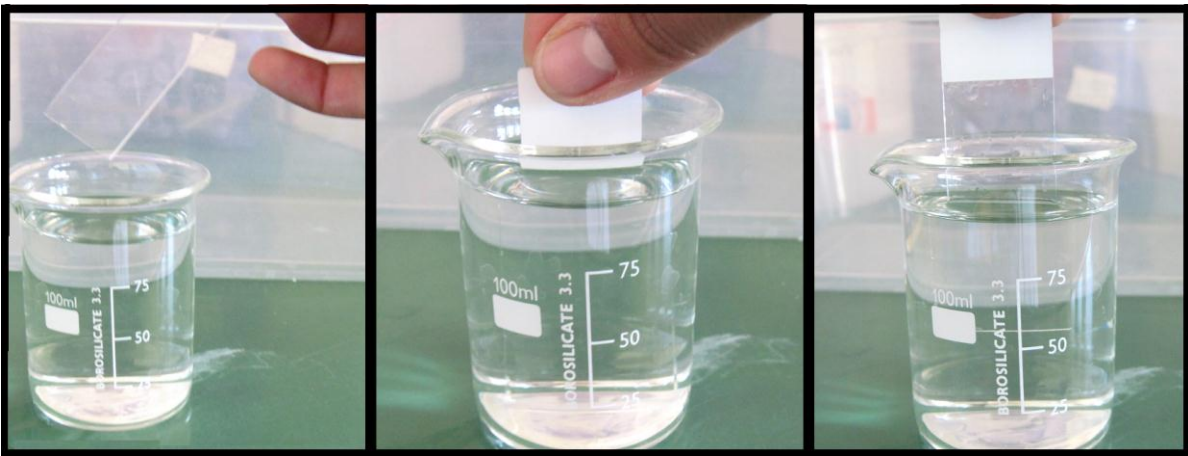


Figura 10: Preparación de la primera capa de agarosa al 1%.

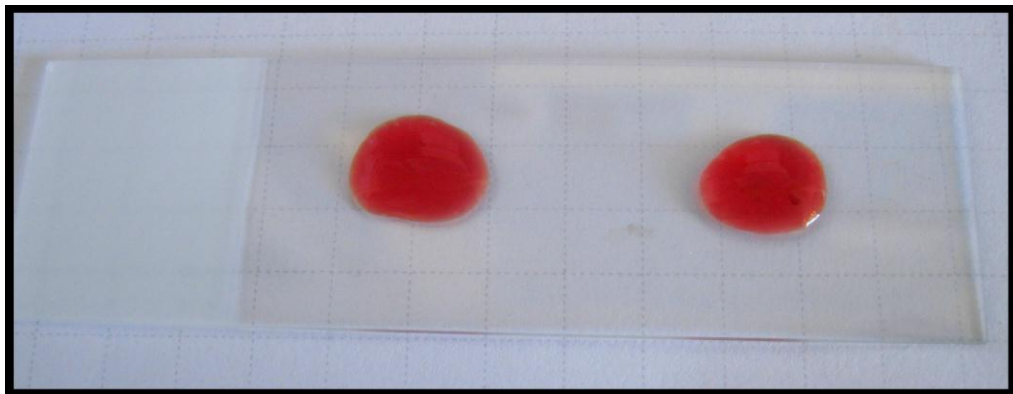


Figura 11: Mezcla celular, agarosa al 1% y buffer fosfato salino.

De la mezcla de (células, LMA y PBS) se tomaron 10 μ L los que se agregaron a los portaobjetos y rápidamente se cubrieron con un cubreobjetos (1,24 X 60 mm). Se dejó solidificar a 4°C durante 5 a 10 minutos, transcurrido ese tiempo, se retiraron los cubreobjetos intentando no alterar la muestra. A continuación, se colocó la tercera capa de agarosa (LMA) al 0,5 % en agua destilada sobre la segunda capa. Nuevamente se colocó el cubreobjetos y se dejó solidificar también por 5 a 10 minutos a 4°C en pocillos con hielo o en el refrigerador, se retiraron los cubreobjetos y se prepararon las muestras para la solución de lisis.

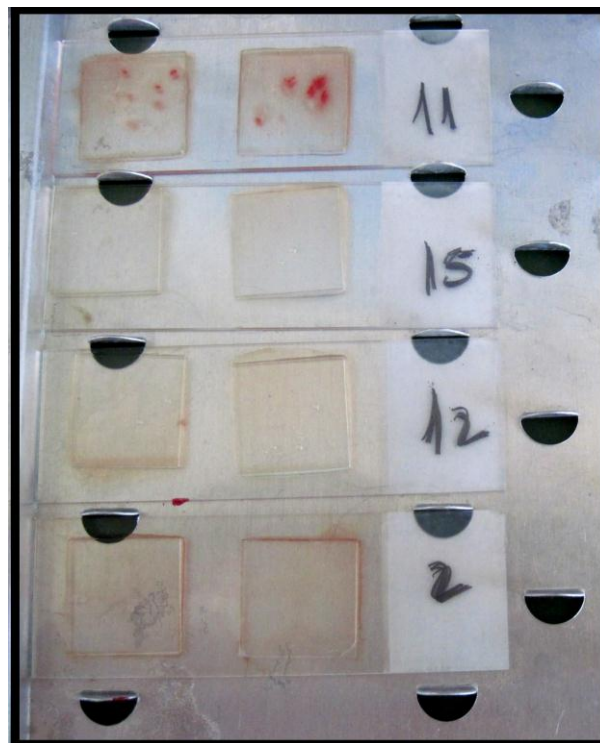


Figura 12: Preparación final de los microgeles de agarosa.

16.3 Lisis celular

La solución de lisis se compone de 2.5 M (8 g) NaCl, 100 mM (37,2 g) EDTA, 10 mM (1,2 g) Tris- base, 8 g NaOH; (el pH se debe ajustar a 10 utilizando 0, 1 M de HCl o 1 M NaOH), DMSO 10 %, 1% de tritón X-100 (Rajaguru et al., 2003; Scalón et al., 2010; Zhang et al., 2011). Se disuelve la solución por 20 minutos aproximadamente a 4°C, para asegurar estabilidad de los geles a los portaobjetos, posteriormente en una cámara de vidrio se agrega la solución de lisis por una hora. A partir de aquí todo el procedimiento se realizó en oscuridad para evitar el daño que podría producir la luz en el DNA.

Altas concentraciones de sal y detergentes en la solución permiten que las membranas citoplasmáticas y nucleares se desintegren, además de la eliminación de RNA, proteínas nucleares y restos citoplasmáticos (McArt, 2009).



Figura 13: Portaobjetos en solución de Lisis alcalina.

16.4 Desnaturalización y Electroforesis

Transcurrida una hora en la solución de lisis, se retiraron los portaobjetos. Las muestras se colocaron en una cámara de electroforesis, evitando dejar espacio entre ellas, en aquellos casos en donde no cubra las preparaciones la superficie de la cubeta de electroforesis se recomienda llenar con portaobjetos para tener una mayor uniformidad en el paso de la corriente.

Posteriormente se lleno la cámara con el buffer de electroforesis (1 mM EDTA y 300 mM NaOH para obtener un pH > 13) de manera que las preparaciones queden totalmente sumergidas en el (evitar la formación de burbujas). Las preparaciones se dejaron en la solución durante 20 minutos para permitir el desenrollamiento del ADN (antes de usar la solución se debe medir el pH para asegurar que sea >13) (Fedeli et al., 2010; Orioux, 2011; Scalón et al., 2010).

Transcurrido ese tiempo se procedió a la electroforesis durante 30 minutos (el tiempo depende de la muestra y del propósito de estudio) a 100 voltios. (Para establecer la orientación de las preparaciones, se deberán marcar los portaobjetos en el área esmerilada).



Figura 14: Cámara de electroforesis junto a las preparaciones.

16.5 Neutralización y fijación:

Una vez finalizada la electroforesis, se retiraron los portaobjetos con cuidado del tanque y se colocaron en una caja o pocillo plano para someterlo al tampón de neutralización (se realizaron 3 lavados durante 5 min cada vez). El tampón se preparo con 0,4 M (48,5 g) Tris con 800 ml de agua bidestilada, se ajusto el pH a 7,5 (con HCl fumante) para neutralizar la alcalinidad del tampón de electroforesis y eliminar posibles restos de detergentes que podrían interferir en la tinción (Rajaguru et al., 2003; Scalon et al., 2010; Orieux et al., 2011; Zhang et al., 2011).

Si se desea, la muestra puede ser deshidratada durante 10 minutos con etanol o metanol frio (Orieux et al., 2011). La deshidratación con alcohol (etanol o metanol) permite almacenar los portaobjetos durante un tiempo antes de su uso, cuando sea conveniente se debe hidratar la muestra con agua destilada fría durante 10 minutos y se deja secar.

Las preparaciones deben quedar a temperatura ambiente, guardadas en cajas oscuras para evitar la luz directa.

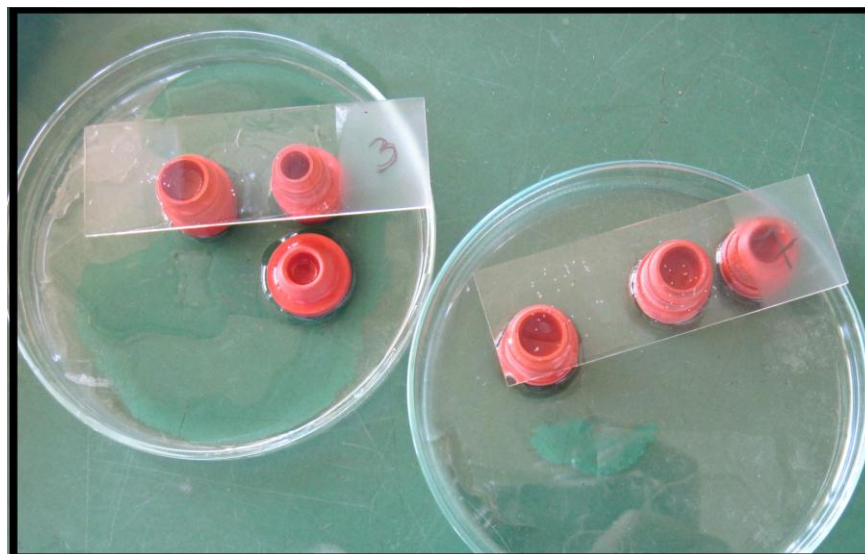


Figura 15: Portaobjetos sometidos a neutralización.

16.6 Tinción y visualización

Se colocaran 20 μ L de bromuro de etidio 1X sobre cada una de las preparaciones difundir con la punta de la pipeta sin tocar el portaobjetos. Posteriormente se colocan los cubreobjetos sobre ella (se deben rotular las muestras).

La visualización se realizo utilizando un microscopio de epifluorescencia, equipado con un filtro de excitación de 480- 550 nm y un filtro de barrera de 590 nm. El conteo de células se realizo visualmente, seleccionándolas al azar y contabilizando 100 células. Para la cuantificación del daño genotóxico, en nuestro caso se considera el porcentaje del DNA en la cola como parámetro de evaluación. Estudios previos han demostrado que es más adecuado que la longitud de la cola o el momento de la misma, ya que es más sensible a altas dosis y más fácil de interpretar.

Cabe recordar que todas las etapas se deben realizar a 4°C, excepto las de tinción y almacenamiento que pueden efectuarse a temperatura ambiente.



Figura 16: Microscopio de epifluorescencia.

16.7 Medición de daño

La determinación de la forma, tamaño y cantidad de ADN dentro de los cometas es muy importante en la prueba si el daño se va a evaluar con precisión. Existen además otros métodos para hacer el ensayo mucho más fiable y reproducible. Uno de esos métodos es la cuantificación visual como análisis por fotografías y la otra es a través de análisis computacionales. Aunque los exámenes visuales proporcionan información bastante útil del daño de ADN, se puede utilizar cuando el software no se encuentre disponible (Kumarabel et al., 2007).

Investigadores han desarrollado métodos visuales de conteo que no requieren de software para el análisis de imágenes. (Collins et al., 1995), publicó un método visual de conteo que califica a los cometas en 5 categorías donde los grados van de 0-4 (Figura 3). Por ejemplo si 100 cometas son calificados y a cada cometa se le atribuye un valor de 0 a 4 de acuerdo a su categoría, la numeración total para el gel de la muestra sería 0-400 unidades arbitrarias (Andrade et al., 2004; Egito et al., 2010; Ghisi et al., 2010; Scaloni et al., 2010; Simoniello et al., 2009), contándose de la siguiente manera:

TCS (conteo total de la muestra) = [(% de células en clase 0) x 0] + [(%de células en clase 1) x 1] + [(%de células en clase 2) x 2] + [(%de células en clase 3) x 3] + [(%de células en clase 4) x 4]

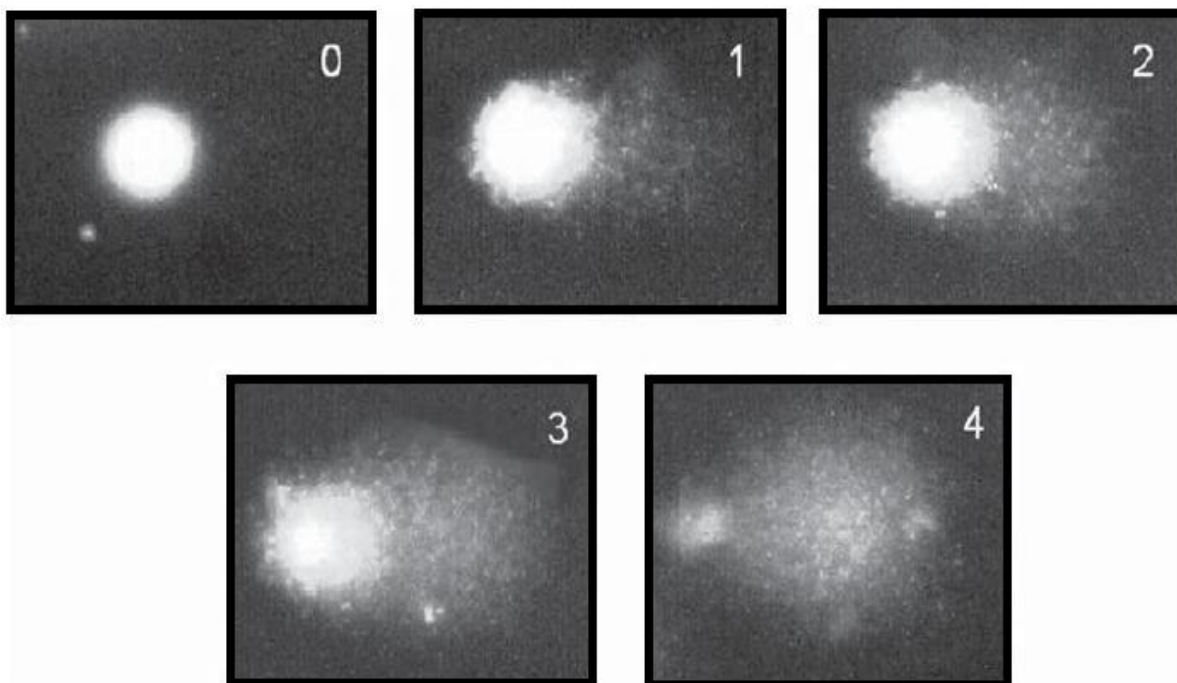


Figura 17: Clasificación visual sugerida por Collins et al., 1995. Imagen que representa las 5 categorías utilizadas en el análisis visual en linfocitos humanos teñidos con DAPI.

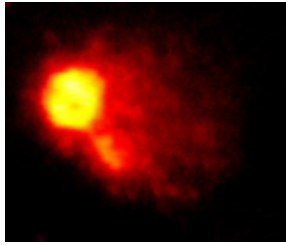
La obtención de resultados en el ensayo del cometa in vivo deberá estar basada en el conteo de 100 células por animal, es decir, por cada réplica se cuentan 50 células (Mohanty et al., 2011). El conteo visual es rápido como simple y debería apelar a aquellos que desean descubrir la utilidad de la técnica sin la necesidad de invertir en costosos equipos de análisis.

18. Análisis Estadístico:

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SYSTAT versión 5.0 copyright 1990-1992 SYSTAT, INC., con el cual se realizó el análisis ANOVA, Tukey al 5 % de probabilidad ($p < 0,05$) para comparar la respuesta de los peces a las distintas desembocaduras. Para correlacionar las respuestas genotóxicas y las características químicas de las aguas se realizó el análisis de correlación de Pearson.

VII. Resultados

19. Estandarización de la Técnica bajo condiciones de Laboratorio (Tabla 1)

Lisis (Horas)	Tiempo de Electroforesis (minutos)			Observación
	20	30	40	
1	<ul style="list-style-type: none"> • Baja migración de los fragmentos. • Núcleos íntegros en la mayoría de los casos (Esférico). • Escasa silueta de cometas. • Bajo ruido de fondo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Óptima migración de fragmentos desde el núcleo. • Núcleo íntegro en la mayoría de los casos. (Cielo estrellado) • Muy escasa silueta de cometas. • Bajo ruido de fondo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Buena migración pero los cometas se comienzan a ver más juntos. • Núcleo íntegro en la mayoría de los casos. • Muy escasa silueta de cometas. • Bajo ruido de fondo. 	<p>Tiempo óptimo de exposición a la solución de Lisis.</p> <p>Tiempo óptimo a para la electroforesis 30 minutos.</p> 
2	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor presencia de siluetas de cometas. • Presencia de cometas con núcleos irregulares. • Ruido de fondo producido por los fragmentos desprendidos del núcleo 	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor presencia de siluetas de cometa. • Escasa presencia de núcleos definidos, (deforme). • Ruido de fondo producido por los fragmentos desprendidos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Silueta de cometa en la mayoría de los casos. • Escasa presencia de núcleos definidos y en ciertos casos nulos (deforme). • Alto ruido de Fondo producido por los fragmentos desprendidos. 	<p>Mucho tiempo de lisis, alta ruptura celular.</p>

20. Análisis morfométrico de los peces

20.1 Relación entre la Masa Corporal y la Longitud

M. cephalus lisa y *Odontesthes brevianalis* capturados tanto del río Aconcagua como del río Maipo no presentan diferencias significativas en su masa corporal, pero si con *Odontesthes brevianalis* del estero de Catapilco ($p < 0.05$). Con respecto a su longitud no existen diferencias significativas entre *M. cephalus* y *Odontesthes brevianalis* de la desembocadura del Aconcagua y *M. cephalus* del Río Maipo. Pero si, con *Odontesthes brevianalis* del río Maipo y del estero de Catapilco.

Tabla 2: Prom (X) \pm S.D de la masa corporal y de la longitud en *Mugil cephalus lisa* y *Odontesthes brevianalis*.

Desembocadura	Especies	Masa Corporal (g)	SD	Longitud (cm)	SD
Aconcagua	<i>M. cephalus L</i>	20,8 ^a	3,2	11,8 ^c	0,8
	<i>O. brevianalis</i>	25,1 ^a	2,9	13,8 ^c	0,9
Maipo	<i>M. cephalus L</i>	27,8 ^a	6,8	12,8 ^c	1,1
	<i>O. brevianalis</i>	26,8 ^a	2,5	15,1 ^d	0,5
Catapilco	<i>O. brevianalis</i>	40,5 ^b	12,7	16,2 ^d	1,9

Las letras diferentes corresponden a diferencias estadísticamente significativas entre las masas corporales y las longitudes ($p < 0,05$).

20.2 Factor de Condición

La figura 18 muestra la relación entre el daño genético (TCS) y el factor de condición en peces capturados en las desembocaduras del río Aconcagua, Maipo y estero de Catapilco. Se observa que no existe una correlación entre el factor de condición y el TCS ($r = 0,6$).

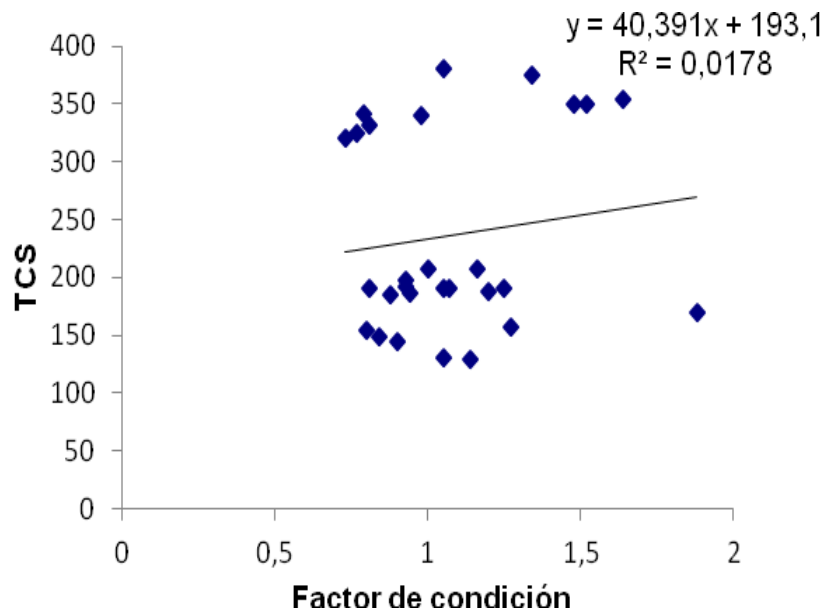


Figura 18: Relación entre el factor de condición y el daño genético (TCS) en *M. cephalus lisa* y *O. brevianalis*.

21. Viabilidad celular:

La viabilidad celular en las muestras de sangre en peces del río Aconcagua fue superior al 81 %, en el río Maipo fue de 84 % y en la desembocadura de Catapilco 100 %. Lo que valida el estudio debido a que la viabilidad fue superior al 75 %.

22. Análisis de las muestras de agua

22.1 Caracterización fisicoquímica de la muestras de agua

Las temperaturas oscilan entre los 18,5 ° C (Aconcagua) y 22, 8°C (Catapilco). Con respecto al pH son todos alcalinos, encontrándose más altos en las aguas sin actividad minera (Catapilco) y más bajo en las aguas del río Maipo. El agua que presentó mayor conductividad eléctrica y sólidos disueltos fue Catapilco (50 dS/m; 2,56 E⁻⁵ ppm) en comparación con las otras dos desembocaduras. (Tabla 3)

Tabla 3: Caracterización fisicoquímica de la muestra de agua

Desembocadura	T°	pH	Conductividad eléctrica (dS/m)	Sólidos disueltos (ppm)
Aconcagua	18,5°C	8,5	22,5	1,12 E ⁻⁵
Maipo	19,7°C	8,2	12,8	6,5 E ⁻⁶
Catapilco	22,8°C	8,8	50,4	2,56 E ⁻⁵

22.2 Concentración de metales totales en la muestra de agua

El agua proveniente de la desembocadura de Catapilco presenta las mayores concentraciones de Cu seguido del río Maipo, el que además presenta concentraciones de Pb superiores a las demás aguas. En relación a la concentración de Zn fue levemente más alta en el río Aconcagua en comparación a la del río Maipo y Catapilco. **(Tabla 4)**

Tabla 4: Concentración de metales totales en la muestra de agua.

Desembocadura	Cu (mg/L)	Pb (mg/L)	Zn (mg/L)
Aconcagua	< 0,005	0,07	0,065
Maipo	0,016	0,18	0,019
Catapilco	0,028	< 0,01	0,013

23. Rango de la concentración de metales en branquias en *Mugil cephalus lisa* y *Odontesthes brevianalis* estudiadas en el río Aconcagua, Maipo y estero de Catapilco.

La tabla 5 muestra que en las tres desembocaduras el rango más alto de metal presente en branquias es el Zn y que este se bioacumula en concentraciones más elevadas en *O. brevianalis* que en *M. cephalus lisa*. Con respecto a la concentración de Cu en branquias, *M. cephalus lisa* y *O. brevianalis* de la desembocadura del Aconcagua fueron los que presentaron el rango más alto de acumulación, seguido de la desembocadura de Catapilco, no así Maipo que presentó en casi todos los casos concentraciones inferiores a 1,5. En todas las especies el Pb se presentó en concentraciones muy bajas, siendo en algunos casos indetectable. (Tabla 5)

Tabla 5: Rango de la concentración de metales en branquias \pm S.D

	Aconcagua		Maipo		Catapilco
Especie	<i>M. cephalus</i>	<i>O. brevianalis</i>	<i>M. cephalus</i>	<i>O. brevianalis</i>	<i>O. brevianalis</i>
Cu (mg/Kg)	1,6 - 3,5	0,5 - 1,9	<1,5 - 1,5	< 1,5	<1,0 - 1,9
Prom (X)	2,3	1,3	-	-	1,6
DS	0,7	0,6	-	-	0,49
Pb (mg/Kg)	<1,5 - 2,8	<1,5 - 19,1	<1,5 - 2,2	<1,5 - 2,2	<1,5
Prom (X)	-	8,2	-	-	-
DS	-	9,4	-	-	-
Zn (mg/Kg)	13,2-18,1	7,5 - 34,8	13,9 - 16,1	29,4 - 40,7	26,7 - 37,3
Prom (X)	15,8	28,6	15	35,6	30,6
SD	1,7	10,9	1,1	5,7	4,6

* Aconcagua: n = 6; Maipo y Catapilco n = 3

24. Cálculo del factor de bioacumulación obtenido de organismos colectados en distintos sitios de muestreos:

La tabla 6 muestra que la capacidad de bioacumulación de los organismos es independiente de la concentración de metales en el agua (Tabla 4).

Tabla 6: Factor de bioacumulación de *M. cephalus* y *O. brevianalis* colectados en los distintos sitios de muestreo.

Desembocadura	Especie	Metal	Bioacumulación	Metal	Bioacumulación
Aconcagua	<i>O. brevianalis</i>	Cu	57.14	Zn	440
	<i>M. cephalus</i>	-	-	Zn	243
Maipo	<i>O. brevianalis</i>	Pb	117.14	Zn	1873.6
	<i>M. cephalus</i>	-	-	Zn	789.4
Catopilco	<i>O. brevianalis</i>	-	-	Zn	2353.8

25. Cuantificación del daño total en las muestras de sangre:

En la tabla 7 se muestra la cuantificación del daño total (TCS) de la muestra en el ensayo, donde se encontró que el daño más bajo se produjo en *O. brevianalis* del río Aconcagua. Las aguas de la desembocadura del río Maipo son las que provocan mayor daño en el ADN de *M. cephalus lisa* y *O. brevianalis*.

Tabla 7: Frecuencia de células en cada clase de cometas y daño total de la muestra (TCS) \pm SD obtenidas mediante el ensayo del cometa en cada muestra de sangre de *M. cephalus lisa* y *O. brevianalis*. Las letras diferentes (a, b y c) indican diferencias significativas respecto al TCS y el (*) indica diferencias significativas respecto a la frecuencia de células en clase 0 ($p < 0,05$).

Frecuencia de células en cada clase de cometas (Prom \pm DS)

Desembocaduras	0	1	2	3	4	Daño en las células (%)	TCS
Aconcagua							
<i>M. cephalus</i>	13 \pm 4.09	29.6 \pm 7.73*	24.5 \pm 2.50*	23.33 \pm 6.53*	9.5 \pm 6.31	86.9 \pm 4.09 ^a	186.6 \pm 20.19 ^a
<i>O. brevianalis</i>	19 \pm 2.75	36.16 \pm 9.7*	24.16 \pm 9.6	16.16 \pm 9.41	4.16 \pm 4.08*	80.6 \pm 2.75 ^c	153.6 \pm 25.06 ^c
Maipo							
<i>M. cephalus</i>	0 \pm 0	0 \pm 0	3 \pm 4	35.8 \pm 11.1*	61.2 \pm 13.0*	100 \pm 0 ^b	358.1 \pm 15.75 ^b
<i>O. brevianalis</i>	0 \pm 0	3 \pm 3.55	14.75 \pm 7.8*	32 \pm 4.96*	50.25 \pm 8.05*	100 \pm 0 ^b	329.5 \pm 8.69 ^b
Catopilco							
<i>O. brevianalis</i>	0 \pm 0	11.5 \pm 3.72*	84.33 \pm 4.96*	3 \pm 2.19	0.5 \pm 0.54	99.3 \pm 0 ^a	189 \pm 2.52 ^a

26. Relación entre las concentraciones de Cu, Pb y Zn en branquias y TCS en *M. cephalus lisa* y *O. brevianalis* :

En la figura 19 se muestra la relación que hay entre la concentración de Cu y el daño genético (TCS). El coeficiente de correlación de Pearson es ($r=0,63$) lo que marca una tendencia, resultando ser estadísticamente significativa ($p<0,05$).

M. cephalus lisa a diferencia de *O. brevianalis* presentan mayor acumulación de Cu en sus branquias por lo que el daño total (TCS) es mayor (Tabla 5).

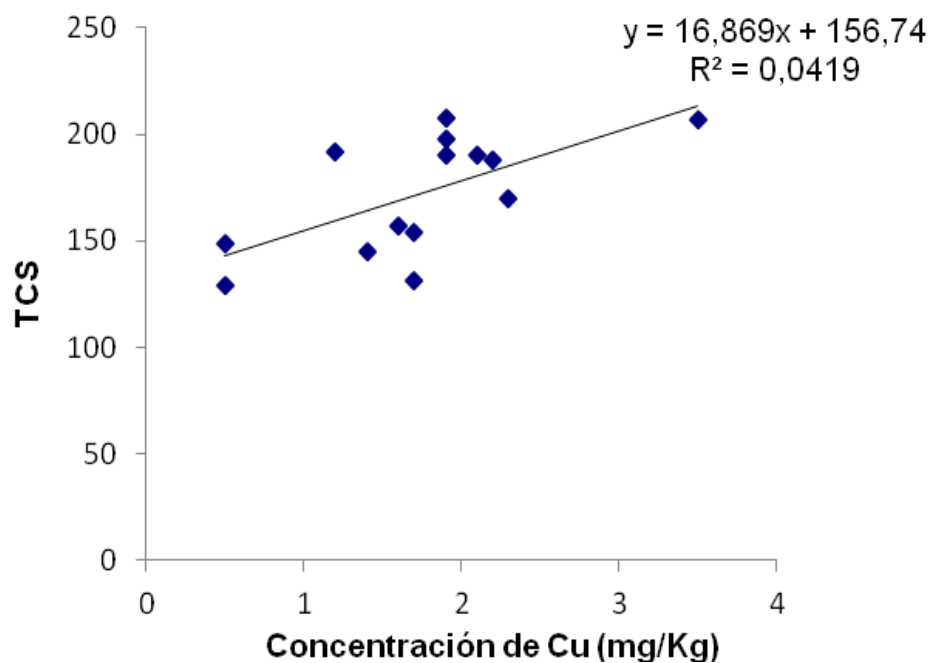


Figura 19: Relación de la concentración Cu presentes en branquias (*M. cephalus lisa* y *O. brevianalis*) y el TCS.

En la figura 20, se observa que no existe una correlación entre la concentración de Pb acumulada en las branquias de *M. cephalus lisa* y *O. brevianalis* en relación al nivel de daño genético ($R = -0,43$). En muy pocas especies se encontró presencia de Pb en branquias, detectándose en la gran mayoría de ellas concentraciones $< 1,5$ (Tabla 5).

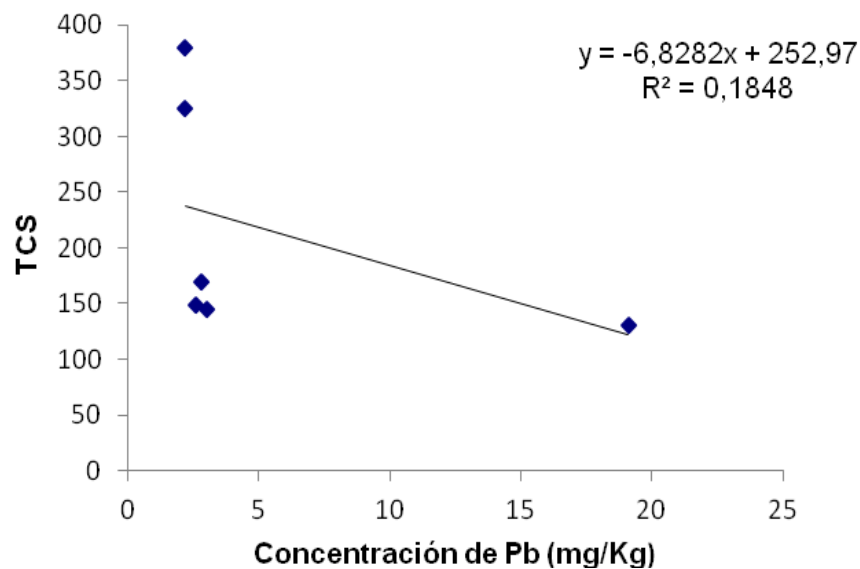


Figura 20: Relación de la concentración Pb presentes en branquias (*M. Cephalus lisa* y *O. brevianalis*) y el TCS.

En la figura 21 se observa, que no existe correlación entre el TCS y la concentración de Zn ($r = -0,19$).

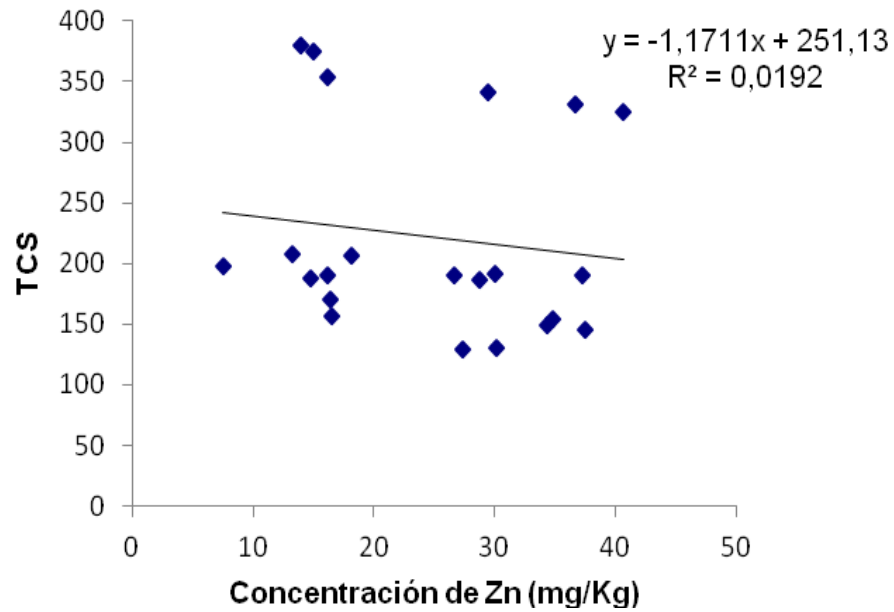


Figura 21: Relación de la concentración Zn presentes en branquias (*M. cephalus lisa* y *O. brevianalis*) y el TCS.

27. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre los resultados del ensayo y las concentraciones de metales medidas

En la tabla 8 se observa que el ensayo del cometa (TCS) mostró una tendencia lineal con la concentración de Zn presentes en las branquias de *M. cephalus lisa* (-0,94) y *O. brevianalis* (-0,99) de la desembocadura del río Maipo y que también hubo una relación lineal con la concentración de Cu (- 1,00) y Pb (-0,98) en *O. brevianalis* de Catapilco y Aconcagua. Sin embargo solo la concentración de Zn en *O. brevianalis* del rio Maipo resultó ser estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Desembocadura	Especie	TCS	Cu (mg/L)	Pb (mg/L)	Zn (mg/L)
Aconcagua	<i>M. cephalus lisa</i>	186,6	0,54	*	- 0,23
	<i>O. brevianalis</i>	151	0,50	-0,98	- 0,75
Maipo	<i>M. cephalus lisa</i>	329,5	*	*	- 0,94
	<i>O. brevianalis</i>	358,1	*	*	- 0,99
Catapilco	<i>O. brevianalis</i>	187,3	- 1,00	*	0,16

(*)No se determino coeficiente de correlación (r). Concentraciones < 1,5.

Tabla 8: Coeficiente de Correlación de Pearson (r) entre los resultados de ensayo y las concentraciones de metales medidas.

VIII. Discusión

Dentro de los parámetros fisicoquímicos del agua, el pH influye en el sentido que determina la proporción de metal total que está en forma cationica, que es la que generalmente se considera tóxica para las especies. Los trabajos científicos que estudian esta relación encuentran que a medida que disminuye el pH acuático, los metales pasan a formas iónicas más fácilmente absorbibles por los peces y otros organismos. Por lo tanto el efecto del pH es importante ya que determina la especiación química. A pH ácidos existe una mayor solubilidad y por tanto disponibilidad de los iones metálicos, por lo que aumenta la toxicidad de los metales pesados. En nuestro caso los pH presentes en las desembocaduras fueron: 8.5 Aconcagua; 8.2 Maipo y 8.8 Catapilco. Sin embargo solo la desembocadura del Aconcagua y el estero de Catapilco se encuentran dentro del intervalo del contenido normal.

Dentro de los sólidos disueltos medidos en las tres muestras de agua la desembocadura del estero de Catapilco fue la que más lo presentó ($2,56 \text{ E}^{-5}$ ppm) en comparación a la desembocadura del Aconcagua ($1,12 \text{ E}^{-5}$ ppm) y Maipo ($6,5 \text{ E}^{-6}$ ppm). Los sólidos disueltos tienen un efecto protector ya que forman complejos con el metal pesado, reduciendo la cantidad de metal libre en el agua. Cabe destacar que no todos los metales se unen a la materia orgánica con la misma afinidad. El Cu es el que más se une, seguido del Cd, Pb y Zn (Hollis, 1997).

En cuanto a la conductividad eléctrica (dS/m) se observó que en la desembocadura del estero de Catapilco fue mucho mayor (50,4 dS/m) en comparación a la desembocadura del río Aconcagua (22,5 dS/m) y Maipo (12,8 dS/m), esto indica que el río Maipo al contener un bajo contenido de sales, tiene una baja interacción de los iones salinos con el metal quedando así una mayor disponibilidad de metales en el agua.

Si comparamos la cantidad de sólidos disueltos y la conductividad eléctrica en el agua, podemos inferir que el río Maipo es el que presenta mayor biodisponibilidad de los metales, seguido del río Aconcagua y desembocadura del estero de Catapilco.

En el análisis de la muestra de agua, de los tres metales totales medidos (Cu, Pb y Zn). La desembocadura del estero de Catapilco es la que posee las concentraciones de Cu más elevadas (0,028 mg/L) en comparación a la desembocadura del río Maipo (0,016 mg/L) y Aconcagua (<0,005 mg/L), sin embargo todas ellas están por debajo del límite máximo permitido.

Llama bastante la atención que la concentración de Cu en el estero de Catapilco sea mayor en relación a las otras dos desembocaduras, ya que no se observaron plantas industriales aledañas a ella, pero sí una decena de industrias (Codelco) y termoeléctricas (AES gener) que rodean a la localidad de Puchuncaví, en la V región. Donde se observa que en alguna de ellas sale humo amarillo, hay poca vegetación, en las calles prácticamente no se observa gente y los caminos se encuentran llenos de polvo, provocando una dispersión del material particulado a la zona.

Recientemente un estudio de suelo procesado por el instituto de salud pública de la región y publicado por La tercera había evidenciado altas concentraciones de arsénico, cobre y otros metales en suelos de la greda.

En relación al Pb se encontró que hubo una mayor concentración en la desembocadura del río Maipo (0,18 mg/L) seguido del río Aconcagua (0,07 mg/L). El río Maipo sobrepasa el valor del máximo permitido a diferencia de la desembocadura del río Aconcagua y del estero de Catapilco que están dentro de los intervalos normales.

Esto puede deberse a las emisiones o descargas de industrias cercanas que utilizan Pb en su actividad liberándolo a la atmosfera y transformándolo en una de las principales fuentes de contaminación de los alrededores. El problema del plomo surge cuando se vierten a los medios acuáticos, donde la contaminación del agua por plomo no se origina directamente por el plomo sino por sus sales solubles en agua que son generadas por las fábricas de pinturas, industrias químicas y por algunas actividades mineras. El Pb que penetra en los sistemas fluviales se retira pronto del agua superficial hacia los sedimentos, adsorbiéndose a la materia orgánica y arcilla, donde finalmente precipita como sales insolubles.

En el caso del Zn, este se presentó en concentraciones más elevadas en las muestras de agua del río Aconcagua (0,065 mg/l) seguido del río Maipo (0,019 mg/l) y Catapilco (0,013 mg/l). Sin embargo todas se encuentran dentro de los intervalos normales.

El hecho que el río Aconcagua presente las concentraciones más elevadas de Zn se debe a que la principal contaminación de Zn en el medio ambiente proviene de los residuos industriales derivado de sus usos.

Márquez et al., 2008 realizó un estudio en donde indica que la concentración de estos metales en las muestras de agua fue de: Cu ($1.8E^{-5}$ – $1.18E^{-4}$ µg/l); Pb no fue detectada y la de Zn ($3.0 E^{-5}$ – $4.3 E^{-4}$ µg/l). Todas bajo el límite máximo permitido por la legislación Venezolana.

La concentración de metales en agua superficial contribuye a la acumulación de metales en branquias y riñón de peces. Las branquias se exponen a metales a través del agua ya que están constantemente en contacto directo. Los riñones están expuestos a los metales del agua porque la sangre fluye desde las branquias a la arteria carótida, que aporta sangre al riñón (Amundsen, 1997). Estos metales son ingeridos con las partículas de materia orgánica por los organismos bénticos los pueden acumular y mover a lo largo de la cadena trófica. Es por ello que la concentración detectada en los sedimentos y tejidos se puede utilizar para evaluar su toxicidad potencial para la vida que los circunda.

Los metales presentes en los tejidos de invertebrados nos documentan una ruta a través de la cual los metales se mueven hacia arriba en la cadena trófica. Tanto así que los invertebrados pueden influir en las concentraciones de los metales acumulados en los macroinvertebrados bénticos y por tanto en peces.

Las especies como *M. cephalus lisa* utilizan tres diferentes vías para captar el metal que está asociado al sedimento: absorción por las branquias como la vía más directa e importante, por el tracto digestivo de finas partículas que son resuspendidas en la columna de agua, lixiviado de los contaminantes sedimentarios del agua los cuales son acumulados en el cuerpos del pez vía respiración y contacto directo a través de la piel almacenándose finalmente en los tejidos musculares.

La resistencia de organismos acuáticos a los contaminantes, como los metales pesados es motivada por la aclimatación fisiológica o adaptación evolutiva. Un número extenso de estudios llevado en los laboratorios con diferentes especies marinas han mostrado como la absorción de metales pesados afecta ciertos genotipos, alterando consecuentemente los diferentes genes. Esta alteración ha producido una reducción de diversidad genética que podría llevar potencialmente a la inestabilidad de la población, incrementando el riesgo de desaparición de poblaciones en los ecosistemas (Márquez et al., 2008; Amundser et al., 1997).

Al analizar las concentraciones de Cu, Pb y Zn en los tejidos branquiales (Tabla 5) se observa que la mayor concentración de Cu se encuentra presente en *M. cephalus lisa* y *O. brevianalis* de la desembocadura del río Aconcagua y en concentraciones inferiores en Catapilco y Maipo. El hecho que en casi todas las especies de las distintas desembocaduras y estero presenten concentraciones bajas de Cu se debe principalmente a que los metales pesados tienen órganos más a fines que otros para acumularse.

Carrquiriborde et al., 2008 observó que al exponer a pejerrey a distintas concentraciones de Cu, Cr y Cd. La concentración de metales acumulados en branquias fue mayor en Cd que en Cu, debido a que el Cu entra fácilmente en el cuerpo y se acumula en el hígado 20 veces más que el Cd. Esta diferencia muestra la capacidad de los mecanismos de regulación de Cu en branquias que son capaces de restablecer rápidamente un nuevo estado de equilibrio en respuesta a cambios en los niveles de metal por el agua. Por el contrario no existe un mecanismo regulador de Cd o Cr en las branquias de pejerrey.

En mamíferos se ha sugerido que el hígado juega el mayor papel en la protección de exposiciones crónicas a Cu al producir metalotioneínas y al actuar como lugar de almacenamiento. En un estudio realizado por Robinson y Avenant- Oldewage, (1997) en Tilapia (*Tilapia mossambica*) se vio que hígado acumuló mayor cantidad de Cu con respecto a otros órganos. Esta elevada concentración de Cu se atribuye a la unión de este con la metalotioneínas para formar complejos como mecanismos de detoxificación. Por lo tanto, es posible que el Cu presente en los peces del río Maipo y de la desembocadura de Catapilco se encuentren en el hígado en cantidades mayores que las encontradas en branquias.

Con respecto al Pb, en casi todas las especies de las tres desembocaduras se encontraron concentraciones $<1,5 \text{ mg/Kg}$ (Tabla 5). Esto se debe principalmente a que el Pb al igual que el Cu se acumula en concentraciones mucho elevadas en el hígado, seguido de las branquias y en concentraciones muy inferiores en el musculo.

El Zn fue el que más se concentro en todos los tejidos branquiales (Tabla 5). La mayor presencia de contaminantes en las branquias se debe a su exposición directa de este órgano con el agua y por lo tanto a los compuestos tóxicos (Licata et al., 2003). Este tejido está expuesto a cantidades mayores a tóxicos que los pulmones de un animal terrestre. En las branquias el agua y la sangre fluyen a contracorriente, el epitelio es muy delgado, solo dos capas de células, con una gran área de contacto. Estas son las características que facilitan la absorción y son similares a las que se presentan en el epitelio de los órganos de absorción de los animales terrestres.

El promedio de las concentraciones de metales obtenidas en tejidos branquiales (Tabla 5) en *Mugil cephalus lisa* fueron superiores a las obtenidas por Márquez et al., 2008 en donde las concentraciones fueron $(1,30 \text{ } \mu\text{g/l})$ Cu; $(0,22 \text{ } \mu\text{g/l})$ Pb y $(0,36 \text{ } \mu\text{g/g})$ Zn.

Peces recogidos en lagos de Alaska contenían concentraciones de Zn de entre 80-170 $\mu\text{g/g}$ (hígado) y 17-35 $\mu\text{g/g}$ (musculo) (Allen-gil et al., 1997).

Un estudio realizado por Licata et al., 2003 indica que las concentraciones de Zn en *Liza aurata* son más altas en branquias $(9151,7 \pm 3450 \text{ } \mu\text{g/kg})$ en comparación a las encontradas en músculos $(7312,3 \pm 896 \text{ } \mu\text{g/kg})$, en el caso del Cu fue todo lo contrario se encontró que fue más alto en musculo $(2800,4 \pm 671 \text{ } \mu\text{g/kg})$ que en las branquias $(962 \pm 98.78 \text{ } \mu\text{g/kg})$, en el caso del Pb se acumulo mas en branquias $(418,6 \pm 286 \text{ } \mu\text{g/kg})$ que en musculo $(385,9 \pm 101,2 \text{ } \mu\text{g/kg})$. Estas concentraciones son mucho más altas a las obtenidas en este trabajo.

Como forma de conocer los niveles de concentración en el agua y en los tejidos se calculó el índice de bioacumulación por metal para las especies estudiadas a partir de la concentración promedio de los metales disueltos. La tabla 6 muestra que la capacidad de bioacumulación de los organismos es independiente de la concentración de metales en el agua (Tabla 4). De acuerdo a los resultados aquí obtenidos, pareciera ser que la incorporación de metales depende de las características químicas del elemento y de la capacidad del organismo para bioconcentrarlo.

La variabilidad observada en el nivel de concentración de metales en los tejidos parece que responde a tres componentes; posición en la escala trófica o hábitos alimenticios de las especies estudiadas; ubicación de las estaciones en relación a las fuentes de introducción de metales y lugar donde fueron colectado los organismos (gradientes de exposición) capacidad de bioacumulación que es propia de cada especie analizada y las características de cada metal en particular.

Las concentraciones medidas de metales pesados en branquias en peces del río Benue fueron Cu 2.98 mg/Kg con un índice de bioacumulación de 178 ; Pb 1.00 mg/Kg con un índice de bioacumulación de 17.3 y en Zn 7.15 mg/Kg con un índice de bioacumulación de 229 en *Tilapia Zilli* y en *Clarias Gariepinus* la concentración de Cu fue 2.07 mg/Kg con un índice de bioacumulación de 105; Pb 1.28 con un índice de bioacumulación de 13.3 y Zn 7.05 mg/Kg con un índice de bioacumulación de 226 (Eneji,2011). Tanto la concentración de metales presente en branquias como el factor de bioacumulación son mucho más bajos en comparación a los obtenidos en nuestro estudio.

Por lo tanto, estos factores muestran que a pesar de los bajos niveles de estos metales en el agua superficial puede haber una buena bioacumulación en algunos peces, el hecho de que las concentraciones de metal en el agua sean más bajos que los encontrados en tejidos es motivo de alerta si los niveles de agua siguen aumentando.

Los hábitos ecológicos de las diferentes especies, afectan en gran forma la captación del metal por el pez. *Mugil cephalus lisa* son detritívoras que viven en fondos someros de la plataforma continental y aguas litorales. Estudios realizados en E.E.U.U en peces que se alimentan del fondo o sedimentos han demostrado que tienen una media de la concentración de Zn 36 µg/g (Kidwell, 1995).

Los peces concentran metales pesados en el cuerpo en proporciones variables, que dependen de la especie, las condiciones medio ambientales y los procesos inhibitorios. Subsecuentemente, estos organismos constituyen una fuente importante de alimento para los humanos, por lo que se establece como una fuente potencial indirecta de metales que entra al organismo. Estos elementos a la vez generan una serie de efectos metabólicos, fisiológicos, conductuales y ecológicos. Los resultados en esta investigación reflejan quizás, dos posibles procesos que contribuyen a la forma como es asimilado el metal por cada una de las especies. En primer lugar el tipo de alimentación y en segundo una progresiva bioacumulación ya sea a partir de la absorción del metal desde el agua o desde el sedimento. La concentración de la mayoría de los metales evaluados en el agua y en los tejidos se encuentran en baja concentración, pero no es descartable la bioacumulación a partir del agua, puesto que la asimilación de bajas concentraciones en periodos de tiempo prolongados induce estos mecanismos en los organismos, además pueden ejercer graves daños a nivel celular dada su capacidad para desnaturalizar proteínas, ser asimilados por el fitoplacton y organismos filtradores e incorporados a la cadena alimenticia provocando graves alteraciones ecológicas y biológicas, no solo al ecosistema, sino también a los seres humanos. (Márquez et al., 2008).

Debido al hecho de que los sistemas biológicos representan la principal diana para numerosos contaminantes ambientales, estos pueden proporcionar importante información que no se podría obtener del análisis químico de muestras ambientales. Así, cada vez es más frecuente en programas de control ambiental y monitorización recurrir a la medida de biomarcadores de exposición o determinar directamente los efectos de los contaminantes en los organismos. Por lo tanto, las monitorizaciones químicas y biológicas no son determinaciones excluyentes sino complementarias, para evaluar los efectos causados por los contaminantes en un medio ambiente donde es esencial seleccionar los organismos apropiados y es importante demostrar que la respuesta genotóxica de esos organismos se encuentra relacionada con la presencia de los contaminantes en el ambiente (Lafton , 2006).

Con respecto a la estandarización de la técnica del cometa se obtuvo que el tiempo óptimo para realizar el ensayo era de una hora en la solución de lisis y 30 minutos en la solución de electroforesis al igual que Orioux et al., 2011. Además se obtuvieron imágenes de todos los tipos de daño, las cuales fueron comparadas con las imágenes descritas por Collins et al, (1995) de lo que se obtuvo un patrón comparativo, que se utilizó en la clasificación de daño en las fases posteriores.

Al utilizar el sulfato de cobre como tóxico se observó que transcurrida una hora de exposición, los peces tenían dificultades para desplazarse y para respirar en donde el movimiento de las branquias fue cada vez más nulo. Autores como Feledi et al., 2010 indican que el contenido de Cu en los eritrocitos producen un aumento de la hemólisis en las células y una disminución significativa del contenido de hemoglobina al exponer a peces a una concentración subletal de sulfato de cobre. Esto ocurre ya que en la superficie de la membrana así como a nivel del citosol, los iones cobre están involucrados en diversas reacciones redox que llevan a un aumento de la producción de radicales seguido por el daño oxidativo y la destrucción de la bicapa lipídica, lo que puede contribuir a un evento hemolítico.

Además de nucleos dañados, se observaron que ovocitos también presentaban daño evidente, demostrando que no solo el sistema inmunológico del organismo se ve comprometido, sino que también el sistema reproductivo.

En cuanto a comparaciones con otras técnicas, para esta investigación fue utilizado el método de conteo y clasificación de cometas visual descrito por Collins et al., 1995, un método simple que presenta muchas virtudes, una de ellas es el bajo costo, ya que no necesita sistemas ni programas sofisticados, además el entrenamiento visual del contador es rápido y sencillo, características que hacen de ésta una técnica ampliamente utilizada y recomendada. Burlinson et al., 2007 realizaron un estudio comparativo de técnicas de conteo y clasificación de cometas, entre otros aspectos del método, y concluyen que es preferible, pero no requerido, utilizar un método de análisis computacional, sin embargo una de las dificultades que tiene el conteo visual es que no toma la intensidad de la cola como un factor de importancia y tampoco determina con certeza qué porcentaje del ADN se encuentra en la cabeza y qué porcentaje se encuentra en la cola, problemas que son todos resueltos por un sistema de análisis computacional.

Pese a esto, se ha demostrado que los resultados obtenidos con el sistema de conteo visual se correlacionan muy bien con las mediciones realizadas con el sistema de análisis de imagen (Collins et al, 1995; Zuñiga, et al., 2009), de hecho Møller, (2006) compara 63 estudios que utilizan simultáneamente el método de conteo visual y el sistema de análisis de imagen, obteniendo resultados de correlación estadísticamente significativos (Bolados, P & Zumaeta, V. 2011).

Con respecto al ensayo del cometa existe una escasez en cuanto a estudios que realicen ensayos utilizando la técnica del cometa con aguas naturales, debido a que la mayoría de los investigadores utilizan bioensayos con concentraciones conocidas de compuestos químicos, para estos casos es usual encontrar una relación dosis-respuesta con los contaminantes (Ahmed et al., 2011; Orioux et al., 20011). La utilización de bioensayos con concentraciones conocidas de tóxicos no refleja lo que realmente sucede en las aguas, a diferencia de los ensayos, donde los resultados reflejan las condiciones reales del sector de muestreo.

En cuanto al ensayo del cometa se observa que existe un mayor nivel de daño en eritrocitos de *Mugil cephalus lisa* y *Odontesthes brevianalis* de la desembocadura del río Maipo. En este caso se observó que los niveles de daño se encontraban entre los estados 3, 4 (Tabla 7) con un TCS total de (358,1 y 329,5). Lo sigue el estero de Catapilco donde el mayor nivel de daño se presentó en la clase 2 con un TCS total de (187,3), a continuación el río Aconcagua en donde el mayor nivel de daño se presentó entre las clases 1, 2, 3 en *Mugil cephalus lisa* con un TCS de (186,6), no así *Odontesthes brevianalis* donde el mayor nivel de dato fue el tipo 1 con un TCS de (151).

En la tabla 7, se observa que las especies del río Maipo presentan diferencias significativas en el TCS total ($p < 0,05$) en relación a las del río Aconcagua y a las del estero de Catapilco, esto se debe principalmente a que el nivel de daño en ambas especies de peces es mucho más alta. *Mugil cephalus lisa* de la desembocadura del río Aconcagua y *O. brevianalis* del estero de Catapilco no presentan diferencias significativas entre ellas, pero sí con las especies del río Maipo y con *O. brevianalis* del río Aconcagua ($p < 0,05$), además este último presenta diferencias significativas con todas las especies presentes en las desembocaduras.

Al correlacionar el nivel de daño genético con las concentraciones de metales acumuladas en tejidos de branquias (Figura 19), se observa que a medida que aumenta la concentración de Cu aumenta el TCS ($r = 0,63$), esta correlación es estadísticamente significativa ($p < 0,05$). El Cu es un metal traza esencial para los organismos vivos y cumple un papel como cofactor para enzimas esenciales, en concentraciones muy altas en el medio ambiente la toxicidad para los organismos puede ocurrir. No hay duda que la exposición a concentraciones excesivas de Cu puede dañar las células y órganos, porque los iones de Cu y sus complejos pueden inducir la formación de especies reactivas de oxígeno que pueden dañar biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN por lo que la toxicidad de Cu a nivel celular depende de la permeabilidad de las membranas celulares a los iones de Cu y de su participación en las reacciones redox (Fedeli et al., 2010).

En el caso del Pb (Figura 20), se observa que no existe una correlación lineal entre el TCS y la concentración del metal ($r = - 0,43$). Esto puede deberse a que la principal vía de acceso de los compuestos de Pb al organismo son el tracto gastrointestinal y los pulmones. Además se encontró que en las aguas de las tres estaciones de muestreo las concentraciones de Pb fueron las menos acumuladas lo que explicaría la baja presencia de este en las branquias.

Si bien el Zn fue el metal más bioacumulado en tejidos branquiales, fue el que menos correlación tuvo con el TCS ($r = - 0,19$). Se observa que a en ciertas especies a concentraciones más altas de Zn disminuye el nivel de daño (Figura 21), esto puede ser explicado a través de la activación de genes de las enzimas que metabolizan el citocromo p450 en varios tejidos y que proporciona un mecanismo de defensa contra los contaminantes (Sharma et al., 2007). La disminución del daño genético indica una reparación del ADN, pérdida de células muy dañadas o ambos. Esta relación inversa entre la concentración y el daño al DNA puede ser debido a la toxicidad de los contaminantes que pueden perturbar la actividad enzimática en la formación de daño en el DNA. (Ali et al., 2008).

Se esperaba que Maipo y Aconcagua sitios que reciben fuertes descargas urbanas y que están localizados cerca de descargas industriales presentaran mayores niveles de contaminación en comparación a Catapilco. En esta investigación se evidencia la genotoxicidad de las aguas estudiadas, pero no existe una correlación entre la concentración de metales en tejidos branquiales y la respuesta biológica, a excepción del Zn en *O. brevianalis* del río Maipo (Tabla 8) y del Cu en las especies capturadas de las tres desembocaduras (Figura 20) que resultó ser estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Esto puede deberse al uso de las aguas, donde existen factores físicos y químicos que interaccionan con los contaminantes, influyendo directamente en su disponibilidad para los organismos vivos.

Una manera indirecta de medir el efecto o el resultado de las interacciones entre una población de animales y su medio ambiente es a través de su condición corporal. La condición corporal es una medida relativa del estado nutricional o del nivel de reservas energéticas en el cuerpo de un animal. Presumiblemente, animales con una buena condición corporal estarán en buen estado nutricional y tendrán tasas de mortalidad menores que aquellos de una población en mala condición corporal (Luque, 1999). Esto se debería a que en animales con un estado nutricional inadecuado el volumen de grasa se ve afectado y por lo tanto la movilización de los contaminantes será mayor (Reijnders, 2008). Para medir la condición corporal se utilizó el factor de condición el cual es una relación entre la masa corporal y la longitud de la especie.

En la tabla 2 se observa que los peces de la desembocadura del río Aconcagua y Maipo no presentan diferencias significativas en relación a su masa corporal pero sí con las especies presentes en el estero de Catapilco ($p < 0,05$) quienes presentan un promedio de masa casi dos veces mayor. La figura 19 indica que no hay una relación entre el factor de condición y el TCS ($r = 0,6$) por lo que el nivel de daño genético no tiene mucha relación con el estado nutricional de la especie.

El factor de condición calculado para cada especie fue: *Mugil cephalus* ($K = 1,29$) y *Odontesthes brevianalis* (0,94) de la desembocadura del Aconcagua. *Mugil cephalus* (1,41) y *Odontesthes brevianalis* (0,78) de la desembocadura del río Maipo y *Odontesthes brevianalis* del estero de Catapilco (0,95).

Desafortunadamente, a pesar de que se evidencia claramente un nivel más bajo de masa corporal en especies de la desembocadura del río Aconcagua y Maipo en comparación a las especies del estero de Catapilco, no es posible aseverar si los peces de la zona de estudio se encuentran o no en un estado de nutricional desfavorable, ya que no existen estudios que indiquen cuál es la masa y longitud que debería tener una pez para ser considerado como saludable. Por lo tanto, se hace necesario que futuros estudios se aboquen en entender como los valores morfométricos podrían estar dando cuenta de mejor manera la condición corporal de un individuo y sus efectos en su fitness.

A pesar de que *Mugil cephalus lisa* y *Odontesthes brevianalis* son especies resistentes, no resultaron ser igualmente abundantes en todos los sitios de muestreo esto se puede deber por la baja calidad ambiental debido a las descargas industriales y domesticas cercanas. El control sobre la disponibilidad de metales para *Mugil cephalus lisa* y *Odontesthes brevianalis* es diferente según el metal y la especie, lo que refleja que múltiples procesos están influenciando la biodisponibilidad de metales en la naturaleza. La interacción entre la geoquímica de los metales y la fisiología animal determina las diferencias en la biodisponibilidad entre los metales tóxicos. Por tanto existen diferencias interespecificas en las concentraciones de metales debido a los diferentes requerimientos y procesos fisiológicos de las especies, lo cual podría explicar la diferencia en la concentración de metales presentada por *Mugil cephalus lisa* y *Odontesthes brevianalis* (Cardoso et al., 2008).

El uso de peces como indicadores biológicos en los programas de vigilancia de la contaminación en ambientes acuáticos es ampliamente reconocido. El principal objetivo de la vigilancia ha sido la de proporcionar información continua y fidedigna sobre la calidad de los alimentos marinos en materia de salud humana, así como la de comprobar los procesos que ocurren en las zonas afectadas de un punto de vista ambiental. El uso de indicadores biológicos de la contaminación es eficiente cuando la información básica sobre aspectos biológicos y ecológicos de los ambientes de evaluación está disponible. Algunos de los requisitos para seleccionar bioindicadores adecuados son, la abundancia, la facilidad de toma de muestras durante todo el año, la identificación de los organismos seleccionados, su capacidad para acumular los contaminantes y el hecho de que permiten un acercamiento multitrófico.

La estimación de daño al ADN en el pescado puede ser llevado a cabo con una gran variedad de muestras de tejidos. Los eritrocitos son de primera elección ya que estas células son fáciles de recoger, sin sacrificar al animal y no es necesario aislar tejido. Se utilizo *Mugil cephalus lisa* y *Odontesthes brevianalis* debido a que estos peces han demostrado ser lo suficientemente sensibles a los compuestos antropogénicos (Marcovecchio et al., 2004; Márquez et al., 2008; Andrade et al., 2004; Mohanty et al., 2011; Carriquiriborde et al., 2008)

IX. Conclusión

- La técnica fue implementada exitosamente, quedando estandarizada para estudios posteriores en las condiciones actuales de laboratorio.
- En esta investigación las aguas de las desembocaduras del río Aconcagua, Maipo y del estero de Catapilco presentaron efecto genotóxico sobre *Mugil cephalus* y *Odontesthes brevianalis*.
- Los parámetros fisicoquímicos medidos en las muestras de agua se encuentran dentro del rango normal que permite la conservación de la biodiversidad acuática a excepción de la desembocadura del río Maipo en donde el pH y el Pb sobrepasan los límites máximos permitidos de la norma secundaria de calidad ambiental para la protección de las aguas continentales superficiales de la cuenca del río Maipo.
- Las concentraciones de metales no se correlacionaron con las respuestas biológicas, por lo que la concentración de metales no puede ser utilizado para predecir el daño evidenciado.
- La prueba del ensayo del cometa utilizado en este estudio, es una herramienta ecotoxicológica necesaria para la evaluación de aguas potencialmente contaminadas y sus posibles consecuencias.
- Las evidencias de genotoxicidad en este estudio constituyen señales de alerta temprana, lo que sugiere que podrían surgir efectos a nivel organismos que aun no se observan.

Glosario

- **Abiótico:** Medio en que no es posible la vida.
- **Afluencia:** Gran cantidad.
- **Agarosa:** Polisacárido que se extrae de las algas. Se caracteriza por formar una matriz inerte y no toxica que supone una herramienta indispensable para una gran cantidad de técnicas de biología molécula.
- **Aneugénico:** Capaces de producir aneuploidia (cambios en el numero de cromosomas).
- **Antropogénicos:** Efectos, procesos o materiales que son el resultado de actividades humanas a diferencia de los que tienen causas naturales sin influencia humana.
- **Bioacumulables:** Característica que presentan algunas sustancias que no se disuelven ni se degradan.
- **Bioensayo:** Proceso mediante el cual se determinan las características y la fuerza de una sustancia potencialmente toxica a través del estudio de sus efectos sobre organismos cuidadosamente escogidos.
- **Biodisponible:** Capacidad de un medicamento u otra sustancia para que el cuerpo la absorba y la use.
- **Biomarcador:** Es una medida de los niveles de contaminación a que se han expuesto los seres vivos.
- **Biótico:** Característico de los seres vivos o que se refiere a ellos.
- **Catádromas:** Especies que viven en agua dulce pero que se aparean o desovan en agua salada.

- Clastogénico: Los agentes clastogénicos son agentes físicos o químicos capaces de inducir roturas cromosómicas.
- Desove: Época en la que los peces y anfibios colocan sus huevos.
- Ecotoxicología: Estudia el destino y los efectos de los contaminantes en los ecosistemas, intentando explicar las causas y prever los riesgos probables.
- Endosulfán: Insecticida y acaricida organoclorado.
- Ensayo del cometa: Técnica que permite evaluar daño en el DNA.
- Escorrentía: Lámina de agua que circula sobre la superficie en una cuenca de drenaje, es decir la altura en milímetros del agua de lluvia escurrida y extendida.
- Especie reactiva de Oxígeno: Moléculas muy pequeñas altamente reactivas que se originan de forma natural y que tienen un importante papel en la señalización celular.
- Floculación: Proceso químico mediante el cual, con la adición de sustancias denominadas floculantes, se aglutinan las sustancias coloidales presentes en el agua, facilitando de esta forma su decantación y posterior filtrado.
- Genotóxico: Tóxico dañino para el DNA.
- Haloeurialina: Seres acuáticos que viven en un amplio rango de salinidades sin que se vea modificado su metabolismo.
- Histona: Tipo de proteína asociada al ADN del núcleo celular.
- Humedales: Zona de tierras, generalmente planas, en la que la superficie se inunda permanente o intermitentemente. Al cubrirse regularmente de agua, el suelo se satura, quedando desprovisto de oxígeno.

- **lilófago:** Se alimentan de detritos y sedimentos comúnmente encontrados en el agua.
- **Lixiviado:** Esgurrimiento de líquidos a niveles inferiores de un suelo mediante drenaje, arrastrando nutrientes, sales minerales y otros compuestos orgánicos.
- **Nucleosoma:** Estructura que constituye la unidad fundamental y esencial de cromatina.
- **Mutagénicos:** Es un agente físico, químico o biológico que altera o cambia la información genética
- **Precipitado:** Materia sólida que por efecto de ciertas reacciones químicas se forma en el seno de una disolución y se deposita más o menos rápidamente.
- **Quelato:** Compuesto de coordinación que resulta de la unión de un átomo central, generalmente metálico, con una molécula orgánica formando una estructura cíclica.
- **Sedimentos:** Materia sólida que después de haber estado flotando en un líquido se queda en el fondo.
- **Xenobióticos:** Se aplica a los compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el hombre.

Bibliografía

1. Afaf M.H. 2009. Mugil Cephalus genome: A sensitive monitor for genotoxicity and cytotoxicity in aquatic environment. *Australian journal of basic and applied sciences*, 3 (3); 2176-2187.
2. Ahmed M.K., Parvin, E., Arif M., Islam, M.M., Akter M.S., Khan M.S. (2011). Genetic damage induced by lead chloride in different tissues of fresh water climbing perch *Anabas testudineus* (Bloch). *Environ Monit Assess*.
3. Ahmed Md. Kawser , Md. Habibullah-al-Mamun, M. Anwar Hossain, Mohammad Arif, Elora Parvin, Mesammat Salma Akter, Mohammad Shahneawz Khan, Md. Monirul Islam. 2011. Assesing the genotóxico potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. *Chemosphere*.
4. Al-yousuf M.H., El-Shahawi M.S. 1999. Trace metals in Lethrinus lentjan fish from the Arabian Gulf (Ras Al-Khaimah, United Arab Emirates): Metales Accumulation in Kidney and Heart Tissues. *Bull Environ Contam Toxicol*, 62:293-300.
5. Ali, D & Kumar S. 2008. Long-term genotoxic effect of monocrotophos in different tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using alkaline single cell gel electrophoresis. *Science of the total environment* 405, 345-350.
6. Amundsen, P.A., Staldvik, F.J., Ludin, A.A., Kushulin, N.A., Popova, O.A., Reshetniko. 1997. Heavy metal contamination in freshwater fish the border region between Norway and Rusia. *The Science of the total Environment*, 201; 211-224.
7. Anderson, D., T.W.Yu, M.A. Browne. 1997. The use of same image analysis system to detect genetic damage in human lymphocytes treated with doxorubicin in the comet and fluorescence in situ hybridization (FISH) assay. *Mutat Res*, 390: 69-77.

8. Andrade, VM., Silvia, J., Silvia, F.R., Heuser, V.S., Días, J.F., Yoneama, M.L y Freitas, T.R. 2004. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the comet assay and micronucleus test. *Environ Mol Mutagen*, 44 (5); 459-68.
9. Belpaeme, K., Cooreman, K., Kirsch-Volders, M. 1998. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutation Research*, 415; 167-184.
10. Bolados, P & Zumaeta, V. 2011. Evaluación del efecto citotóxico y genotóxico de suelos cercanos a centros mineros en el Valle del Aconcagua, en *Eisenia fetida*. Universidad de Valparaiso, departamento de Biología y Ciencias Ambientales. Página 59.
11. Buschmann, A., Fortt, A., Vásquez, J.A., Ahumada, R., Hernández, M.C., Astudillo, C. 2005. *Industria y contaminación marina*, 3-35. 16 de agosto 2011 http://na.oceana.org/sites/default/files/o/fileadmin/oceana/uploads/americadelsur/documents2005/Industria_y_contaminacion_marina.pdf.
12. Calvo de Anta, R.1997. El conocimiento del suelo como principio básico de la gestión de suelos contaminados. *Libro de ponencias 50 aniversario de la sociedad Española de la ciencia del suelo*, Madrid, España.
13. Calderon, F. Pavlova, M., 1999. Metodologías para Análisis químico de Suelos. www.drcalderonlabs.com
14. Campos H., Bucarey Elys., Arenas José. 1974. Estudio limnológicos del lago Riñihue y río Valdivia. Bol. Sociedad. Biología.de Concepción, 48: 47-67.
15. Cardona, L. 2000. Effects of salinity on the habitat selection and growth performance of Mediterranean Flathead Grey Mullet *Mugil cephalus* (Osteichthyes, Mugilidae). *Estuarine, Coastal and shelf Science*, 50: 727-737.

16. Cardoso, I., Granadeiro J.P y Cabral H. 2008. Benthic prey quantity and quality in the main mudflat feeding areas of the Tagus estuary: implications for bird and fish populations. *Red de revistas científicas de América latina y el Caribe, España y Portugal*, 34 (003): 283-296.
17. Carriquiriborde, P., Ronco, A.E. 2008. Distinctive accumulation patterns of Cd (II), Cu (II), y Cr (VI) in tissue of the south American teleost, pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Aquatic toxicology*, 86; 313-322.
18. Castañe, P.M., Topalián, M.L., Cordero, R.R y Salibian, A. 2003. Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad. *Revista de toxicología*, 20 (001); 13-18.
19. Collins, A.R., S.J. Duthie, V.L. Dobson. 1993. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, 14: 1733-1735.
20. Collins, A. R. 2004. The comet assay for DNA Damage and Repair. *Molecular Biotechnology*, 26, 249-261.
21. Contreras, P.J., Mendoza, C.L., Gómez, A. 2004. Determinación de metales pesados en aguas y sedimentos del río HAINA. *Ciencia y Sociedad*, 29 (001); 38-71.
22. COM (Committee on Mutagenicity of Chemical in Food, Consumer Products and the Environment). 2000. Guidelines on a strategy for testing of chemicals for mutagenicity. <http://www.doh.gov.uk/com.htm>
23. Cook, P., I. Brazell, E. Jos. 1976. Characterization of nuclear structure containing superhelical DNA. *J Cell Sci*, 22: 303-324.
24. De Castro A.R., Oliveira P.M., Cavalcanti L.P., Pereira N.A., Vanderli J.A., Dausacker E.B y Carmen Z.C. 2011. Relationship between Mercury concentration in the blood with that in the muscle of four estuarine tropical fish species rio de Janeiro, Brazil. *Bull Environ Contam Toxicol*, 86; 357-362.

25. Dyer, B. 2000. Revision sistemática de los pejerreyes de Chile (Teleostei, Atheriniforme, Systematic review of the silverside fishes of Chile (Teleostei, Atheriniformes). *Estud. Oceanol*, 19:99-127.
26. De la hoz E., Cancino C., Ojeda E. 1994. Capacidades de modulación y plasticidad funcional de los mecanismos de captura de alimentos en Atherinopsinae sudamericanos. *Investigaciones marinas*, 22;45-6.
27. Dhawan, A., M. Bajpayee, D.Parmar.2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol*, 25, 5-32.
28. Diaz –Jamarillo M., Ferreira J.L., Amado L.L., Ventura- Lima J., Martins A., Retamal M.R., Urrutia R., Bertrán C., Barra R y Monserrat J.M. 2010. Biomonitoring of antioxidant and oxidative stress response in *Perinereis gualpensis* (Polychaeta: Nereididae) in Chilean estuarine regions under different anthropogenic pressure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73:515-523.
29. Dusinska , M., A.R. Collins . 1996. Detection of oxidized purines and UV- induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay. *ATLA*, 24: 405 – 411.
30. Dusinská, M., A.R. Collins. 2008. The comet assay in human biomonitoring gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 23:191-205.
31. Egito, L.C., dos Santos, P.E., do Amaral, V.S., de Medeiros, S.R y Agnez-Lima, L.F. 2010. Use of native species *Crenicichla menezesi* (Ariidae) as a model for in situ evaluation of genotoxicity in surface water. *Science of the Total Environment*, 408; 6042–6046.
32. Escobar J. 2002, La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar, Serie Recursos Naturales e Infraestructura, CEPAL, pp 66.
33. Fedeli, D., Carloni, M., Falcioni, G. 2010. Oxidative damage in trout erythrocyte in response to “in vitro” copper exposure. *Marine Environment*, 69; 172-177.

34. Fent, K. 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters*, 140-141; 353-365.
35. Ferrano M.V., Fenocchino A.S., Mantovani M.S., Ribeiro C y Cestari M.M. 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration test. *Genetic an molecular biology*, 27 (1), 103-107.
36. Ghisi, Nde.C., Ramsdorf, W.A., Ferrano, M.V., De Almeida, M.I., Ribeiro, C.A., Cestari, M.M. 2010. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. *Environ Monit Assess*, 180 (1-4); 589-599.
37. Gichner, T & Plewa, M.J. 1998. Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. *Mutation Research*, 401; 143-152.
38. Hollis, L., Muench, L., Player, RC. 1997. Influence of dissolved organic matter on copper binding, and calcium on cadmium binding, by gills of rainbow trout. *Journal of Fish biology*, 50; 703-720.
39. Instituto Nacional de Normalización INN-Chile. Norma chilena Oficial 1333.Of78, modificada en 1987. "Requisitos de calidad del agua para diferentes usos". Segunda edición, 1987. Pág. 3-5.
40. Ittekkot, V., Humborg, C., y Schaefer, P. (2000). Hydrological alterations and marine biogeochemistry: A silicate issue? *Bioscience*, 50(9), 776-782.
41. Jayaprakash, M., Srinivasalu, S., Jonathan, M.P., Mohan, V.R. 2005. A baseline study of physico-chemical parameters and trace metals in waters of Ennore Creek, Chennai, India. *Marine Pollution Bulletin*, 50; 583-608.
42. Jha, A.N., Dogra, Y., Turner, A. & Millward, G.E. 2005. Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: Genotoxic effect and tissue-specific bioconcentration. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 586 (1); 47-57.

43. Kidwell, J.M., Phillips, L.P., Birchard, G.F.1995. Comparative analysis of contaminant levels in bottom feeding and predatory fish using the national Biomonitoring program data. *Bull Environ. Contam. Toxicol*, 54; 919-923.
44. Königsberg, M.F. 2007. Nrf2:La historia de un Nuevo factor de transcripción que responde a estres oxidativo. *Revista de educación bioquímica*, marzo, año/vol.26, numero 001. pp18-25
45. Koppen, G & Verschaeve, L. 1996. The alkaline comet test on plant cells: A new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutation Research* , 360 ; 193-200
46. Kumaravel, T.S., Vilhar , B., Faux , S. p., Jha , A.N. 2009. Comet assay measurements: a perspective. *Cell biol toxicol*, 25: 53-64.
47. Labunska, I., Brigden, K. & Stringer, R. 2000.Contaminantes orgánicos y metales pesados en sedimentos y muestras de agua asociados con el Polo Petroquímico de Ensenada-Berisso, Argentina. 15-4-2011; pág. 2-14 <http://www.ingenieroambiental.com/info/contaorg.pdf>
48. Lafton, B., Aldao, I., Pérez Cadahía, B., Pásaro, E., Méndez, J. Primer pasó en la evaluación de los efectos del fuel del prestige sobre el medio ambiente marino: Disponibilidad, Bioacumulación y daño al ADN. *Ciencias marinas*, vol 32, 389-399.
49. Larrea, P.M. 2007. Evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay, 35 -38 <http://200.7.160.61:8080/rddu/bitstream/123456789/232/1/T626.pdf>
50. Laxmi S.P., Senthilkumar B., Hariharan G., Paneer A.S., Purvaja R y Ramesh R. Bioaccumulation of heavy metals in mullet (*Mugil Cephalus*) and oyster (*Crassostrea madrasensis*) from Pulicat lake, south east coast of india. *Toxicology and industrial Health*, 27 (2); 117-126.

51. Lee, R.F., S. Steinert . 2003 Use of the single cell gel electrophoresis/ comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutations Research*, 544 (1): 43-64.
52. Lemos N.G., Días L.A., Silva-Souza A.T., Mantovani M.S. 2005. Evaluation of environmental waters using the comet assay in tilapia *rendalli*. *Environmental toxicology and pharmacology*. 19: 197-201.
53. Licata, P., Bella G.D., Dugo G y Naccari F. 2003. Organochlorine pesticides, PCBs and heavy metals in tissues of the mullet *Liza aurata* in lake Ganzirri and Straits of Messina (Sicily, Italy). *Chemosphere*, 52: 231-238.
54. Liman, R., Hakki, I.G., Akyil, D., Eren, Y., Konuk, M. 2011. Determination of genotoxicity of fenaninosulf by *Allium* and comet tests. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99; 61-64.
55. Luque, S. (1999). Comparación De La Condición Corporal De Crías De Lobo Marino, *Zalophus Californianus*, En Once Colonias Reproductivas Del Golfo 73 De California. Centro interdisciplinario de Ciencias Marinas, Departamento de Pesquería y Biología Marina. La Paz, Baja California, Instituto Politecnico Nacional.
56. Machado C., Lima P., Alvez R. & Rodríguez R. 2009. 2009. Evaluation of genotoxic effects of xenobiotics in fishes using comet assay- A review. *Reviews in Fisheries Science*, 17 (2); 170-173.
57. Marcovecchio, J.E. 2004. The use of micropogonias *furnieri* and *mugil liza* as bioindicators of heavy metals pollution in La Plata river estuary, Argentina. *Science of the total Environment*, 323: 219-226
58. Márquez, A., Senior, W., Fermín, I., Martínez, G., Castañeda, J., González, A. 2008. Cuantificación de las concentraciones de metales pesados en tejidos de peces y crustáceos de la laguna de Unare, estado Anzoátegui, Venezuela. *Revista científica, enero- febrero, año / vol. XVIII, numero 001. Universidad de Zulia Maracaibo, Venezuela;* 73-86.

59. Martínez G.S, 2007. Interactive data base for redox research. *Havana university pharmacy & food science institute center for research and biological evaluation*.
60. McArt D.G., Mckerr G., Howard C.V., Saetzler K y Wasson G.R. 2009. Modelling the comet assay. *Biochemical Society Transactions*, 37 (4) 914-917.
61. M.M. Hoshina y M.A. Marin-Morales. 2010. Evaluation of the genotoxicity of petroleum refinery effluents using the comet assay in *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *J.braz.Soc.Ecotoxicol*, 5 (n1): 75-79.
62. Menéndez A.N. 2010. Transporte de contaminantes en el medio acuático, 2: 21-22.
63. Meyer, M.J., Bechtold WE (1996). Protein adduct biomarkers: state of the art. *Environ health prospect* 104:879-882.
64. Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*, 399; 135-147.
65. Møller, P. 2006. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutation Research* 612: 84–104.
66. Montagna, P.A., Alber, M., Doering, P., y Connor, M.S. (2002). Freshwater inflow: Science, policy, management. *Estuaries*, 25 (6b) 1243-1245.
67. Mohanty, K., Mohanty, J., Nayak, A., Mohanty, S., Dutta, S. 2011. Application of comet assay in the study of DNA damage and recovery in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings after an exposure to phorate, an organophosphate pesticide. *Ecotoxicology*, 20; 283-292.

68. Mora, A y Alfaro H. 1999. Caracterización y distribución por cantones de la dureza del agua en las fuentes utilizadas para el consumo humano en Costa Rica. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 8 (15); 1409- 1429.
69. Navarro-Aviñó, J.P., Aguilar, I.A., López-Moya, J.R.2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16 (2); 10-25.
70. Navarrete, M.H., Carrera, P., De miguel, M & De la torre, C. 1997. A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. *Mutation Research*, 389; 271-277.
71. Nielsen, V.M., Quesada, M.A. 2006. *Ambientes Marino Costeros de Costa Rica*. pp 13-14.
72. Nixon, S. W. (2003). Replacing the Nile: Are anthropogenic nutrients providing the fertility once brought to the Mediterranean by a great river? *Ambio*, 32(1), 30-39.
73. Nossoni, F. 2008. Single-cell gel electrophoresis (Comet assay): Methodology, Potential Applications, and limitations in cáncer research. *MMG 445 Basic Biotechnology eJournal*, 4:30-35.
74. Olsen S.B., Padma T.V., Richter B.D. Universidad de Rhode Island, Brian D. Richter, *The Nature Conservancy. Guía para el manejo del flujo de agua dulce a los estuarios*. 13-6-2011, http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNADI095.pdf
75. Olive, P.L.1989.Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiat Res*, 117, 79-92.
76. Orioux , N., Cambier , S., Gonzalez , P., Morin , B., Adam , Christelle., Laplace , G-J., Bourdineaud, J.P. 2011.Genotoxic damages in zebra fish submitted to a polymetallic gradient displayed by the lost River. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4):974-83.

77. Ostling, O., K.J. Johanson. Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem med*, 1987; 52: 683-691.
78. Ostling O., K.J.Johanson. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem biophys Res Commun*, 123: 291-298.
79. Piperakis S.M. 2008. Comet assay: A brief History. *Cell Biol Toxicol*.
80. Piperakis, S.M. 2009. Comet assay: A brief history. *Cell biol Toxicol*. 25:1-3.
81. Poirier MC, Weston A (1996). Human DNA adduct measurements: stateof the art. *Environ health prespect* 104: 883-893.
82. Pritchard, D.W.(1967). Whats is an estuary: Physical viewpoint. En G.H. Lauff (ED.), *Estuaries* .Washington, D.C: *American assiciation for the advancement of Science*, 52-63.
83. Quiroz , S. & Moreno , D. 2009. Guia de campo. Peces dulceacuícolas de la región de Valparaiso. Pagina 34.
84. Rabalais, N.N., y Nixon , S.W.(2002). Preface: Nutrient over-enrichment of the coastal zone. *Estuaries*, 25 (4B), 639.
85. Rajaguru, P., Suba, S., Palanivel, M y Kalaiselvi, K. 2003. Genotoxicity of a polluted River System Measured Using the alkaline Comet assay on Fish and Earthworm Tissues. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 41; 85-91.
86. Reijnders, P., A. Aguilar and A. Borrel (2008). Pollutions and Marine Mammals *Encyclopedia of Marine Mammals*

87. Robinson, J., Avanant-Oldewage, A. 1997. Chromium, copper, iron and manganese bioaccumulation in some organs and tissues of *Oreochromis mossambicus* from the lower Olifants River, inside the Kruger National Park. *Water SA*, vol 23, n°4; 387-403.
88. Ruiz V & Marchant M. 2004. Ictiofauna de aguas continentales chilenas. Universidad de Concepción. Departamento de Zoología. Proyecto de Docencia N° 98-071, 356 p.
89. Rydberg, B., K. Johanson. 1978. Estimation of single strand breaks in single mammalian cells. In: Hanawalt, P.C., E.C. Friedberg, C.F. Fox, (ed). DNA repair mechanism . New York, NY: *Academic*, 465-468.
90. Santos, S.J, N.P.Singh, A.T. Natarajan. 1997. Fluorescence in situ hybridization with comets. *Exp cell Res* , 232: 407-411.
91. Scalon, MCS., Rechenmacher, C., Siebel ,AM., Kayser, ML., Rodrigues, MT., Maluf ,SW., Rodrigues, MAS y Silvia LB. (2010). Evaluation of Sinos River Water genotoxicity using the comet assay in fish. *Braz.J.Biol*, 70(4 suppl.), 1217-1222.
92. Shaposhnikov, S., E. Frengen , A. Collins. 2009. Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization- a review. *Mutagenesis*, 24: 383-389.
93. Seth, C.S., Misra, V., Chauhan, L.K.S., Singh, R.R. 2008. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of allium cepa: cytogenetic and comet assay approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71; 711-716
94. Shaposhnikov, S., V.B. Salenko, G. Brunborg, J. Nygren, A. Collins. 2008. Single-cell gel electrophoresis (The comet assay): Loop or fragments ?. *Electrophoresis*, 29: 3005-3012.

95. Shugart LR. Biomarkers of DNA damage (1996). In: de serres FJ, Bloom AD. Ecotoxicity and human health. A biological approach to environmental remediation. Lewis publisher, USA, PP.123-141.
96. Singh, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*,175: 184-191.
97. Singh, N.P., R.E Stephens. 1997. Microgel electrophoresis: Sensitivity, mechanism, and DNA electrostretching. *Mutat Res*, 383: 167-175.
98. Singh P.J y Mathur P.K. 2007. *Studies on the genotoxicity of Endosulfan in different tissues of fresh water fish Mystus vittatus Using the comet assay. Arch Environ contam toxicol*, 53; 617-623.
99. Simoniello M.F., Gigena F., Poletta G., Loteste A., Kleinsorge E., Campana M., Scagnetti J., Parma M, j. 2009. Alkaline Comet assay for genotoxic effect detection in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bull environ contam toxicol*, 83: 155-158.
100. Solaun O., M.J. Belzunce, J. Franco, V. Valencia y Á. Borja, 2009. Estudio de la contaminación en los sedimentos de los estuarios del País Vasco (1998-2001). 'Revista de Investigación Marina'. 10: 47 pp.
101. S.S. De Silva, 1980. Biology of juvenile grey Mullet: A short review. *Aquaculture*, 19: 31-36.
102. Tolga Cavas y Serpil Könen. 2008. In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquatic toxicology*, 90; 154-159.

103. Vargas C., Contreras M., Vila I. 2002. Edad y crecimiento de *Odontesthes brevianalis* (Günther 1880) en la Laguna Conchalí (31°54', 71° 15'), Chile Gayana Concepción 66(2): 199-202.
104. Vörösmarty, C. J., Green, P., Salisbury, J., y Lammers, R. (2000). Global water resources: Vulnerability from climate change and population growth. *Science*, 289(5477), 284-288.
105. White, P.A., Rasmussen, J.B. 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research* , 410; 223–236.
106. Wogan GN (1989). DNA Adducts as exposure biomarkers and indicators of cancer risk. *Environ health prospect* 105: 907-912.
107. Zhang, L.J., Jia, J.F., Hao, J.G., Cen, J.R., Li, T.K. 2011. A modified protocol for the comet assay allowing the processing of multiple samples. *Mutation Research*, 721; 153-156.
108. Zunino S., Aliaga C y Da Venezia P.2009. Comunidades de peces en la desembocadura de ríos y estero de la Región de Valparaíso, Chile Central. *Revista de biología marina y oceanografía*, 44 (1): 123-130.
109. Zúñiga, L.V.2009. Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana.