



**Facultad de ingeniería
Escuela de Ingeniería en Medioambiente
Ingeniería Ambiental**

**Evaluación del efecto genotóxico de aguas costeras de la
Bahía de Quintero, Ventanas, Playa Carvallo y Montemar
(Quinta Región, Chile Central) sobre *Perumytilus purpuratus***

Trabajo de titulación para optar al título de Ingeniero Ambiental

Mónica Carolina Araya Berríos

PROFESOR GUÍA: Dr. Hernán Gaete Olivares.

PROFESOR CO-GUÍA: Dra. Rosa Guerra Muñoz.

Valparaíso, Chile

2016

Agradecimientos

A mis padres, por enseñarme a ser la persona que soy y por enseñarme con actos de vida cotidianos que todo se puede conseguir a base de esfuerzo. A mis hermanos mayores por ser un ejemplo a seguir y porque sé que siempre estarán allí cuando los necesite. A Víctor, mi amor, por su apoyo incondicional en todo este proceso, por darme ánimos cuando más lo necesité y por su disponibilidad en todo el proceso de toma de muestras de esta tesis y en realidad en todo este largo camino. A mis amigos por su preocupación constante y por su apoyo. A mi Profesor Guía Dr. Hernán Gaete por confiar en mí para desarrollar este trabajo, por su apoyo y por sus enseñanzas. A mi Profesora Co-Guía Dra. Rosa Guerra, si bien ella no tenía planificado trabajar conmigo, fue un gran apoyo durante todo el proceso, sus historias, anécdotas y por supuesto todo su conocimiento me ayudaron a sacar adelante este trabajo. Gracias por su pasión por la enseñanza. A Dios y a la virgen, por jamás dejarme caer. Todo Valió la pena, Gracias

Resumen

En algunas zonas costeras de la Región de Valparaíso se desarrollan diversas actividades antrópicas, entre las cuales se destacan las industrias de fundiciones y termoeléctricas, las que en sus procesos generan residuos que contienen metales. Estos residuos, pueden llegar a las aguas costeras generando un riesgo ecológico para los organismos que habitan estos ecosistemas. Los metales generan efectos tóxicos, entre ellos genotoxicidad. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto genotóxico de las aguas costeras de zonas con una alta actividad industrial en la región de Valparaíso. Para ello se recolectaron en los sectores de Quintero, Ventanas, Playa Carvallo y Montemar moluscos de la especie *Perumytilus purpuratus*, en los cuales se determinaron las concentraciones de metales en tejido y el efecto genotóxico en: hemocitos, espermatozoides y ovocitos. Los resultados muestran que no se encontró relación entre las concentraciones de metales (Cu, Pb, Zn) y el daño genético observado. No obstante, lo anterior, los individuos de la zona de Montemar mostraron un mayor daño en el ADN, siendo las células germinales las más afectadas. En conclusión, en los sectores estudiados existen otros agentes químicos biodisponibles, diferentes a los analizados en este estudio, que provocan genotoxicidad en *P.purpuratus* lo que podría estar afectando la fertilidad de este organismo.

Palabras claves: metales pesados, genotoxicidad, ensayo del cometa.

Índice

1	Introducción	1
1.1	Actividades Portuarias	1
1.2	Actividades generadoras de energía	2
1.3	Actividad minera	3
1.4	Metales pesados	4
1.4.1	Factores que modifican la biodisponibilidad de los metales	5
1.4.2	Toxicidad de los metales	6
1.4.3	Compuestos metálicos y toxicidad	7
1.4.4	Efecto genotóxico producido por los metales pesados	8
1.5	Biomonitores	9
1.5.1	Selección del biomonitor	10
1.5.2	<i>Perumytilus purpuratus</i> (Lamarck, 1819) como bioindicador	11
1.6	Ensayo del cometa	12
2	Planteamiento del problema	13
3	Hipótesis	14
4	Objetivos del estudio	14
4.1	Objetivo general	14
4.2	Objetivos específicos	14
5	Materiales y métodos	15
6	Resultados	20
7	Discusión	27

8	Conclusión	31
9	Referencias bibliográficas	32
10	Anexos	41

Índice de figuras

Figura 1: Matrices tridimensionales de <i>Perumytilus purpuratus</i> en la zona intermareal rocosa superior.	12
Figura 2: Formas de la migración del ADN para distintos tipos celulares, obtenidos en la investigación realizada por Lacazeet <i>al</i> , (2010).	18
Figura 3: Migración de ADN. Grado 0: ausencia de daño; Grado 1: mínima frecuencia de daño; Grado 2: frecuencia media de daño;Grado 3: frecuencia alta de lesiones; Grado 4:máxima expresión de cola de cometa. Barra 10 μm	20
Figura 4: Migración de ADN. Grado 0: ausencia de daño; Grado 1: mínima frecuencia de daño; Grado 2: frecuencia media de daño; Grado 3: frecuencia alta de lesiones; Grado 4: máxima expresión de daño.	21
Figura 5: Migración de ADN. Grado 0: ausencia de daño; Grado 1: mínima frecuencia de daño; Grado 2: frecuencia media de daño; Grado 3: frecuencia alta de lesiones; Grado 4: máxima expresión de cola de cometa... ..	22
Figura 6: Etapa de lisis celular. Muestras sumergidas en vaso coplin con solución de electroforesis (Ph: 10)... ..	41
Figura 7: Tanque de electroforesis conectado a fuente de poder.	42
Figura 8: Etapa de neutralización de las muestras. Lavado de muestras con solución amortiguadora (Ph: 7,5).	42

Índice de tablas

Tabla 1: Elementos trazas encontrados en cenizas volantes (Salazar, 2009).	2
Tabla 2: Categorización de los estados del cometa e interpretación del grado de daño genotóxico acorde a la longitud de la cola (Brugés & Reguero, 2007).	19
Tabla 3: Ensayo Cometa. Promedio de frecuencia celular en cada estado (0 al 4) y número total de la muestra.	23
Tabla 4: Frecuencia celular global en cada estado (0 al IV) y comparación promedio del conteo total de la muestra global (NTM global). Letras diferentes (a-b) indican diferencias significativas ($p < 0.05$).	24
Tabla 5: Concentraciones de metales (mg/L) en agua de mar.	24
Tabla 6: Concentraciones de metales (mg/kg) en tejido corporal completo.	25
Tabla 7: Coeficiente de correlación Pearson entre variables estudiadas.	25
Tabla 8: Promedio de la masa corporal y longitud de <i>P.purpuratus</i>	26

1. Introducción

Los océanos, debido a su extensión, son completamente vulnerables a la contaminación que deriva principalmente de la macro industria y del comercio marítimo, los cuales ayudan en la concentración de metales pesados en los océanos y también de diversas sustancias tóxicas (Kolaveric *et al.*, 2013; Valdés, 2014). Siendo Chile un país con un extenso territorio marítimo con más del 60 % de la población viviendo en ciudades costeras y desarrollando actividades productivas, de transporte, recreacionales y turísticas, es posible encontrar altas concentraciones de xenobióticos provenientes de las zonas urbanas, los cuales, han contribuido a la contaminación del sistema acuático ocasionando un creciente deterioro del ambiente a escala local, regional y global (Iannacone & Salazar, 2007). Las actividades industriales y portuarias aportan con diversos agentes contaminantes, pero destacan los metales pesados debido a que pueden potencialmente provocar genotoxicidad ya sea de forma directa o indirecta (Caffetti *et al.*, 2008; Calderón & Valdés, 2012).

1.1. Actividades Portuarias

Las actividades portuarias pueden provocar alteraciones de las condiciones del entorno natural, mediante la instalación y operación del puerto. Los impactos de ésta actividad pueden llegar a ser considerables. Por otro lado, los puertos se ubican generalmente en los centros urbanos y van generando conflictos debido a sus repercusiones a nivel ambiental (SECTRA, 2010).

Esto incide en la contaminación ambiental debido a la carga que es dispersada por el viento llegando a ecosistemas próximos, tales como el medio marino. Las principales fuentes de contaminación de las aguas se relacionan con los derrames accidentales durante la operación, así como por el escurrimiento de materiales almacenados a granel movilizados por el viento. Esta acción contaminante puede afectar el medio marino incluyendo organismos

bentónicos y planctónicos (CONAMA, 2009).

1.2. Actividades generadoras de energía

En cuanto a la actividad relacionada con la generación de energía, en la región de Valparaíso, la segunda en importancia es la termoeléctrica. En su operación ésta puede utilizar como combustible petróleo, carbón, carbón/petcoke, gas o puede ser de ciclo combinado. Las centrales termoeléctricas, y principalmente aquellas que utilizan carbón, generan gases efuentes que corresponden a material particulado, el cual está compuesto de una mezcla de material sólido y líquido, conformado por distintos compuestos como nitratos, sulfatos, metales, polvo, entre otros (Editec S.A, 2012; Kas ingeniería, 2009).

Además de generar material particulado, las termoeléctricas producen cenizas volantes, las cuales corresponden al residuo fino resultante de la combustión del carbón pulverizado, estas cenizas son depositas en silos de acopio para su almacenamiento temporal. Las propiedades físicas y químicas de los productos de combustión dependen principalmente del tipo de carbón que sea utilizado y las técnicas de combustión empleadas. Las cenizas volantes tienen diferentes elementos trazas en su composición. Algunos de éstos son los establecidos en la tabla 1 (Salazar, 2009).

Tabla 1: Elementos trazas encontrados en cenizas volantes (Salazar, 2009).

Elemento	mg/kg
Ba, Mn, Sr	100-2500
B, Zn, Cr, Cu, Ni, Pb, V, Li	50-500
Co, Rb, As	20-200
Cd, U, Th, Be, Ge, Sn, Se	1-50
Hg	< 1

Al igual que las cenizas volantes y el material particulado, los residuos líquidos provenientes de la planta de energía térmica incluyen descargas de aguas residuales, las cuales tienen una composición química diversa, dependiendo del combustible utilizado para la generación eléctrica, así como también de la etapa del proceso. En este caso existen las aguas residuales asociadas a las cenizas, en donde aquellas centrales que utilizan carbón y diésel, generan cenizas provenientes de la combustión que son recolectadas en estado húmedo, las cuales pueden contener sólidos y metales pesados, entre otras sustancias. Estas cenizas son llevadas a canchas de acopio donde son acumuladas y en donde producto de las lluvias estas podrían escurrir siguiendo el curso natural de las aguas llegando finalmente a los ambientes acuáticos cercanos (SMA, 2014).

1.3. Actividad minera

La actividad minera genera contaminantes en sus diferentes etapas del proceso, entre estos, metales pesados. Los metales pesados se pueden producir por reacciones químicas, los resultados de estas reacciones pueden drenar en aguas superficiales o subterráneas, como ejemplo, se puede nombrar la oxidación de la pirita, importante en el proceso de oxidación-lixiviación, en esta se genera sulfato férrico que aporta iones Fe^{+3} . De esta misma forma otras reacciones químicas van aportando otros metales pesados tales como el cobre, zinc y plomo a los distintos cuerpos de agua circundantes, si éstos llegan a estuarios o zonas costeras los impactos en la vida acuática pueden ir desde efectos sub-letales que afecten el crecimiento, comportamiento, capacidad reproductiva de los organismos, hasta la muerte de éstos (Oyarzun *et al.*, 2011).

Las fundiciones de cobre por su parte, generan emisiones al aire. Estas se caracterizan por contener dióxido de azufre, material particulado y sustancias tóxicas como arsénico, mercurio, plomo y cadmio entre otros. Estos últimos pueden, por acción del viento, viajar largas distancias pudiendo depositarse en algún cuerpo de agua por acción de la gravedad (Gonzá-

lez, 2014).

1.4. Metales pesados

Los metales son elementos químicos que en su mayoría son componentes principales de la naturaleza y suelen ser indispensables para el correcto desarrollo de diversas funciones dentro de los organismos. Los metales esenciales se encuentran en todos los organismos y tienen diversos papeles, como estructurales y también participan en sistemas redox, entre otros. Debido a esto, se sabe que una falta de metales esenciales en los organismos puede acarrear diversos problemas en las funciones biológicas, pudiendo provocar muerte celular, problemas metabólicos, también los organismos pueden ver afectado su crecimiento, reproducción, entre otros. (Cornelis *et al.*, 1993; Fleming, 1989; Macready, 1998; Rojas & Citlalli, 2011).

Entre los metales destacan aquellos denominados metales pesados tales como Plomo, Cadmio, Zinc, Mercurio, Arsénico, Plata, Cromo, Cobre, Hierro, que presentan una densidad relativamente alta y que pueden generar diferentes grados de toxicidad dependiendo de la concentración, tiempo de exposición, entre otros (Carmona, 2009; Duruibe *et al.*, 2007).

Si bien los metales pesados se pueden encontrar en la naturaleza, cuando las concentraciones de éstos aumentan pueden generar diversos daños tanto para los organismos como para el ecosistema en donde estos se encuentran. Los organismos enfrentados a elevadas concentraciones de metales, que superen el requerimiento biológico, pueden sufrir distintos efectos genotóxicos pudiendo producir finalmente problemas fisiológicos, reproductivos (disminuyendo la capacidad reproductiva de los organismos) y comunitario (reduciendo el número de especies) (Carrasco *et al.*, 2006; Valdés, 2014).

El problema medio ambiental de los metales pesados consiste en la dificultad de ser degradados, permaneciendo de esta manera en la biota durante años. Los procesos biogeoquímicos que no pueden degradar los metales pesados, si pueden hacer que formen parte del ecosis-

tema, ya que pueden adquirir características físico-químicas, entre las cuales encontramos el material particulado coloidal y especies disueltas. Los iones metálicos hidratados forman parte de éstas últimas y son considerados como la fracción metálica más biodisponible (Carmona, 2009; Carvajal, 2012).

La biodisponibilidad es la capacidad del metal para ser asimilados, acumulados e incorporado a las funciones biológicas. La acumulación se produce principalmente por la unión con moléculas orgánicas, haciendo difícil su eliminación. La bioacumulación suele agravarse a lo largo de la cadena trófica debido a que se produce el fenómeno de biomagnificación (Carmona, 2009; Vicente, 2010).

1.4.1. Factores que modifican la biodisponibilidad de los metales

La materia orgánica es uno de los factores que modifica la biodisponibilidad, la bioacumulación y por ende la toxicidad. Esto se debe a que la materia orgánica forma complejos reduciendo las concentraciones de otros iones tóxicos. La materia orgánica puede a su vez reaccionar fuertemente con algunos metales especialmente el Cu, encontrándose menos biodisponibles (Rojas & Citlalli, 2011).

El Ph es otro factor condicionante de la adsorción y solubilidad de los metales, este afecta la especiación química y la movilidad de muchos de estos. La dureza del agua tiene estrecha relación con el Ph y es otro de los factores que condiciona la biodisponibilidad, cuando ésta es elevada los metales se ligan a los carbonatos insolubles disminuyendo la biodisponibilidad de estos, un ejemplo de esta interacción es el cobre cuya toxicidad aumenta al disminuir la dureza del agua. El Ph posee también una relación directamente proporcional con la salinidad, esta última es condicionante de la biodisponibilidad debido a que iones metálicos suelen penetrar en la célula a través de los mismos sistemas de transporte que utilizan otros iones importantes como sodio y potasio, estos últimos compiten por los sitios de transporte celular con los metales pesados en cuestión. Igualmente los aniones cloruro y sulfato pueden

formar compuestos más estables con algunos metales (Carvajal, 2012; Vicente, 2010).

Las características intrínsecas del metal también influyen en la toxicidad a generar y en su biodisponibilidad, algunas de estas características son, su naturaleza, debido principalmente a que tal como se nombró, hay metales pesados que son esenciales, pero hay algunos, como el plomo que no lo son y que en pequeñas concentraciones pueden causar mucho más daño a los organismos. Otros factores que van modificando el grado de toxicidad y la biodisponibilidad de éstos compuestos son, el estado de oxidación del metal, el tipo de moléculas orgánicas e inorgánicas y la fase del compuesto metálico, disuelto y/o particulado, (Duruibe, 2007; Vicente, 2010).

Las interacciones de efecto sinérgico o antagónico que puedan establecerse entre los compuestos o iones metálicos con otros, también van modificando la biodisponibilidad ya sea potenciándola o disminuyéndola. Estos tipos de interacción también influye en la toxicidad de los metales pesados en los organismos expuestos (Gaete & Chavez, 2009; Iannacone & Salazar, 2007).

1.4.2. Toxicidad de los metales

Diversos son los factores que afectan la biodisponibilidad de los metales. Pudiendo provocar distintos efectos tóxicos sobre los organismos. El exceso de metales pesado puede desestabilizar los ecosistemas e incluso producir la muerte de los individuos. El efecto tóxico de los metales se manifiesta por la interferencia metabólica y por la mutagénesis que provocan, también se unen a enzimas y a proteínas específicas compitiendo con otras sustancias que son esenciales para el mantenimiento y funcionamiento continuo de las células. Esto podría llevar a consecuencias negativas para la reproducción, desarrollo y competencia de los organismos. Una vez asimilados los metales pesados son ampliamente distribuidos por el cuerpo del organismo hacia distintos órganos, incluyendo glándulas, sistema nervioso central y huesos (Besser & Leib, 2007; Pandey & Mandhuri, 2014).

1.4.3. Compuestos metálicos y toxicidad

Los metales pesados que se encuentran más fuertemente relacionados con las actividades industriales y que son considerados a su vez como contaminantes son: Cadmio, Mercurio, Cobre, Cromo, Níquel, Plomo, Zinc (Valdés, 2014).

- Plomo: 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. Se han descrito efectos sobre diversas enzimas, como la disminución de actividad de la ATP-asa a nivel de la membrana del riñón e hígado. Se destacan también la afinidad del plomo con las mitocondrias en donde se inhibe la fosforilación oxidativa (Pandey & Mandhuri, 2014; Vicente, 2010).
- Cobre: Es un oligoelemento esencial para la biosfera. Esto se debe a que puede servir como cofactor para la activación enzimática y puede unirse a proteínas tales como la cito cromo oxidasa. Al haber un exceso, éste puede unirse a ligando no específicos ocupando así espacios celulares o receptores, cuya función es bloqueada por su presencia. Se ha observado que altos niveles de exposición al cobre han producido daño en el desarrollo y en la reproducción de los animales (Carvajal, 2012; Vicente, 2010)
- Zinc: Al igual que el cobre, es un oligoelemento esencial, esto debido a que participa en numerosas funciones fisiológicas, es cofactor de más de 200 enzimas. El Zinc al igual que los otros metales pesados es dañino en altas concentraciones, especialmente después de una exposición prolongada, el origen de los numerosos problemas a los organismos deriva de la alteración del metabolismo de ácidos nucleicos, daños oxidativos en proteínas y ADN (Vicente, 2010).

1.4.4. Efecto genotóxico producido por los metales pesados

Los metales pesados tienen la capacidad de generar un tipo específico de toxicidad que es la genotoxicidad, esta se refiere al daño provocado en el ADN por diversos agentes contaminantes. El efecto más conocido por el cual los metales pueden producir genotoxicidad, es debido a que estos, ya sean esenciales como no esenciales pueden inducir el estrés oxidativo, el cual se define como un desequilibrio entre la producción de radicales libres y los sistemas de defensa antioxidante, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno que corresponden a radicales libres, iones de oxígeno y peróxidos (ERO) (Bo-Mi *et al.*, 2004).

Diversos estudios han analizado el efecto de la relación entre los metales pesados y el estrés oxidativo. El daño del ADN puede ser a nivel de la transcripción y replicación, pudiendo dar lugar a mutaciones, cáncer e incluso la muerte de los organismos. También se ha demostrado que, a pesar de ser perjudiciales para las células, las especies reactivas de oxígeno pueden también funcionar como moléculas de señalización inducidas por el estrés (De Vizcaya-Ruiz *et al.*, 2008; Matés *et al.*, 2010; Rowe *et al.*, 2008; Srivastava *et al.*, 2006; Valko *et al.*, 2006). En los organismos acuáticos se induce estrés oxidativo debido a la presencia de metales pasados u otros contaminantes, los cuales van generando las especies reactivas de oxígeno, tales como los radicales hidróxilo (HO^-), una especie altamente reactiva que puede modificar las bases de purina y pirimidina y causar roturas de la cadena que dan lugar a daños en el ADN. El anión superóxido (O^{2-}) presente en las células debido a las fugas de la cadena respiratoria en las mitocondrias. El peróxido de hidrógeno H_2O_2 resultante de la dismutación de (O^{2-}) o debido a la acción de enzimas oxidasa. Estos y otros radicales libres pueden dañar macromoléculas tales como proteínas, lípidos y ADN. Debido a que los radicales libres alcanzan la estabilidad mediante la adquisición de electrones provenientes de estas macromoléculas provocando una reacción en cadena de liberación de más radicales libres que tiene como consecuencia el daño en el ADN entre otros (Matés *et al.*, 2010; Bo-Mí *et al.*, 2004).

Los radicales libres pueden generar distintos daños en el ADN, como roturas de cadena simple y modificaciones en las bases nitrogenadas que componen el material genético. Esta acción es potenciada además por los mismos metales pesados que pueden interferir en los mecanismos de reparación del ADN (Carmona, 2009).

1.5. Biomonitores

Los biomonitores son especies en las que su existencia, sus reacciones y su funcionamiento cambian cuando se generan alteraciones en el ambiente en el cual se encuentran. Esto se debe a que presentan sensibilidad a los cambios que en el ambiente se puedan generar y reaccionan a éstos como si fueran estímulos específicos. Por su parte estos estímulos generan información de los cambios ocurridos y en ocasiones también entregan información sobre la magnitud del cambio. Numerosos estudios avalan el uso de biomonitores ante diversos escenarios de contaminación, ya que representan una herramienta de alerta temprana ante cualquier riesgo de contaminación (Hernández *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2011; Van der Wat & Forbes, 2015). En este sentido las normas de calidad ambiental, se basan en la evaluación de la exposición a los agentes químicos, a través de las determinaciones de las concentraciones, sin embargo, la aproximación es insuficiente para la protección de las comunidades biológicas expuestas, ya que no permiten predecir el efecto. La toxicidad de los agentes químicos, como ya fue nombrado, dependen de las interacciones entre ellas (sinérgica, aditiva, antagónica) y de factores ambientales (dureza, materia orgánica, pH, salinidad, entre otros) (Gaete, 2008; Iannacone & Salazar, 2007).

El uso de biomonitores son herramientas complementarias al momento de implementar normas de calidad, con la ayuda de estos organismos de prueba y de diversos bioensayos se puede determinar el efecto de los contaminantes en los individuos (CONAMA, 2004).

1.5.1. Selección del biomonitor

Para poder realizar la selección de la especie a utilizar como biomonitor, es necesario conocer distintas características de su forma de vida, alimentación, época de reproducción, estructura poblacional entre otras. Las particularidades que deben presentar los Biomonitores son:

- Acumular altos niveles del contaminante
- Tener forma de vida sésil/sedentaria/con migración corta.
- Presentar abundancia.
- Presentar amplia distribución.
- Estar a lo largo del año.
- Presentar hábitos de alimentación simple.
- Debe ser preferentemente de importancia ecológica, económica y comercial.
- Obtención los organismos debe ser rentable.

La biomonitorización es el uso regular y sistemático de organismos, da información acerca de la interacción entre las condiciones ambientales y el mundo vivo. La biomonitorización a través de los datos obtenidos en diversos estudios puede ayudar a predecir cambios futuros en organismos y ecosistemas, por estos motivos la biomonitorización permite para desarrollar programas de control efectivo y gestión del medio (Hernández *et al.*, 2000; Páez & Osuna., 2001).

La respuesta de los bioindicadores suele estar dado por un biomarcador, el cual hace referencia a un cambio químico, molecular y fisiológico. La respuesta del biomarcador suele estar asociada con la probabilidad del desarrollo de una enfermedad. El daño en el ADN corresponde a un biomarcador de exposición. Los moluscos son una de las especies que han sido

utilizadas como bioindicador y esto se ve reflejado en los numerosos estudios sobre efectos contaminantes de diversos agentes (Arango, 2011; Baqueiro *et al* , 2007; Rigonato *et al* ., 2005).

1.5.2. *Perumytilus purpuratus* (Lamarck, 1819) como bioindicador

Su amplia distribución geográfica y su alta tasa de fecundidad lo convierten en un buen candidato para estudiar el efecto de la contaminación sobre sus poblaciones. Al igual que otros bivalvos pertenecientes a la familia Mytilidae, *P.purpuratus* en figura 1, es considerado un biomonitor de excelencia para evaluar efectos de contaminación acuática, por una serie de condiciones que han permitido considerarlo como un excelente bioindicador para estudios de monitoreo ambiental de zonas costeras afectadas por acciones de desechos antropogénicos, que en su mayoría están relacionados con los efectos de citotoxicidad y genotoxicidad evaluados especialmente en células libres como en el caso de hemocitos, cuya función principal es la inmunidad (mecanismo de defensa) y los gametos (relacionados con la fertilización), dada la importancia del genoma se ha desarrollado el ensayo del cometa (Acevedo *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2008; Cares & Leny, 2013; Collins *et al.*, 1995., Gosling, 2004; Ostling & Johansen, 1984; Salamanca *et al.*, 2004; Velásquez, 2005; Vargas-Albores & Barroco, 2001).



Figura 1: Matrices tridimensionales de *Perumytilus purpuratus* en la zona intermareal rocosa superior.

1.6. Ensayo del cometa

El ensayo del cometa es una prueba citoquímica utilizada para detectar el daño ocurrido en el ADN causado por agentes genotóxicos, según Ostling & Johansen (1984) y Collins *et al* , (1995). El daño detectado con estos ensayos corresponde a roturas de cadenas dobles y simples mediante electroforesis en condiciones alcalinas. Las ventajas se deben principalmente a ser un método sensible, rápido, sencillo, de bajo costo y aplicable a varios tipos de células eucariontes (Coughlan *et al* ., 2002; González *et al* ., 2012; Lacaze *et al* ., 2010; Zúñiga, 2009; Wong *et al* ., 2005).

2. Planteamiento del problema

Las actividades económicas en la zona central son muy diversas, concentrándose en gran parte empresas que desarrollan actividades industriales, portuarias y mineras, específicamente en las zonas de Ventanas y Quintero presentando un uso intensivo del área costera (GORE, 2012).

Las actividades nombradas anteriormente generan una serie de impactos sobre la población que habita en las cercanías o sobre el medio natural en el que se sitúan. En el caso de los complejos portuarios, presentan problemas asociados a derrames de granel y de aguas de las sentinas. Las Fundiciones por su parte, generan diversas emisiones atmosféricas destacando la emisión de dióxido de azufre y material particulado. Los conflictos ambientales más emblemáticos tienen relación con la contaminación del recurso agua por la descarga en el medio marinos de distintos metales pesados, tales como cobre, zinc, plomo, entre otros (CONAMA, 2000; González, 2014; Salazar, 2009). En relación a lo anterior, se desconoce si estas aguas costeras con alta actividad industrial contienen agentes químicos en concentraciones biodisponibles que pudieran generar daño genético en los organismos acuáticos que habitan este ecosistema, como bivalvos que se caracterizan por ser filtradores y por lo tanto bioacumular agentes químicos como los metales provenientes de las actividades antrópicas que se desarrollan en la zona de estudio.

3. Hipótesis

En esta investigación se postula que las aguas costeras de la Región de Valparaíso de lugares con mayor actividad industrial presentan mayor daño genético que zonas con menor actividad industrial y que se relacionaría con la concentración de metales bioacumulados.

4. Objetivos del estudio

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto genotóxico de las aguas costeras en zonas con actividad antrópica, minera y portuaria en la V Región.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar la genotoxicidad en aguas costeras con actividad antrópica sobre células marcadoras, hemocitos, ovocitos y espermatozoides, de *P. purpuratus*.
- Determinar las concentraciones de cobre, plomo y zinc en las muestras de agua obtenidas en las zonas de estudio y en tejido.
- Relacionar el grado de genotoxicidad de las células marcadoras con las concentraciones de Cu, Pb y Zn en tejido.

5. Materiales y métodos

Recolección de Individuos

Para este estudio se utilizó, *Perumytilus purpuratus* Lamarck (1819) conocido en Chile como chorito "maico", perteneciente a la familia Mytilidae, es una especie bentónica bastante abundante en la zona intermareal rocosa, se encuentra formando densas matrices tridimensionales para incrementar su protección frente al efecto mecánico de las olas (Cares & Leny, 2013; Castro *et al.* , 2008). Los individuos se obtuvieron desde las costas de playa Carvalho, Ventanas, Quintero y en la Estación de Biología Marina Montemar, entre los meses de noviembre y enero. Una vez colectados fueron transportados al laboratorio, en agua de mar a 4°C para evitar estrés térmico, y dejados en acuarios con aireación continua a temperatura ambiente.

Obtención del agua de mar

De los sectores ya nombrados se realizó la toma de muestra de agua de mar para el posterior análisis de metales. El agua fue refrigerada (10°C) y preservada con ácido nítrico (HNO₃) hasta el análisis de metales. Los análisis de metales en agua cruda fueron determinados mediante el método: St Methods 3111B, el cual corresponde al método de aspiración directa, llama aire acetileno. Realizados en el Laboratorio de servicios de análisis de la Universidad de Playa Ancha.

Extracción del tejido corporal

Para el análisis de metales en tejido se midió y pesó a los individuos recolectados, fue necesaria la extracción de 20 gramos de tejido corporal en peso húmedo. Las metodologías utilizadas, NCh2638.Of 01: Determinación de cadmio- Métodos Espectrofotométrico de Absorción atómica por llama NCh2751.Of 03: Determinación de plomo mediante espectrofotometría de absorción atómica.

AOAC 986.15: Método oficial 986.15 As; Cd; Pb; Zn; Se. Multielement method EAA Realizados

en el Laboratorio de servicios de análisis de la Universidad de Playa Ancha.

Extracción de Hemolinfa

La Hemolinfa fue obtenida desde el músculo aductor utilizando una jeringa de 100 μ l.

Ensayo de viabilidad celular

Este ensayo permite conocer el estado de viabilidad de los hemocitos que serán usados. La viabilidad celular se determinó antes de cada prueba y preparación de la muestra, para lo cual se goteó hemolinfa (10 μ l) sobre un porta objeto y luego la muestra fue teñida con eosina Y (0,5 %), las muestras fueron observadas en microscopio óptico 40X. Para dar paso al ensayo del cometa, los individuos debieron presentar una viabilidad celular mayor al 75 % (Mai *et al.* , 2012; Kolaveric *et al.* , 2013).

El método ensayo del cometa consistió en los siguientes pasos:

■ **Preparación de porta objetos y montaje de la muestra:**

Los portaobjetos en donde se depositó la muestra de hemolinfa fueron preparados con anterioridad, en donde se agregó en ellos agarosa de punto de fusión normal al 1dejándose solidificar en estufa por alrededor de 30 min a 45°C. Una vez adherida la capa de agarosa, una cantidad de 10 μ l de hemolinfa fue mezclada con 10 μ l de agarosa de bajo punto de fusión al 1 %, luego se tomaron 15 μ l de esta mezcla y se depositaron en los portaobjetos. Se montó el cubreobjetos y se dejó solidificar a 4°C durante 10 a 15 minutos.

Los cubreobjetos deben ser retirados con mucho cuidado para no despegar del portaobjeto las capas de agarosa que contienen la muestra.

■ **Etapas de Lisis:**

La solución de lisis utilizada se preparó con 2,5M (8g) NaCl, 100mM (37,2g) EDTA, 10mM (1,2 g) Tris- base, 8g NaOH; (el Ph se debió ser ajustado a 10 utilizando 0,1M de HCl o 1 M NaOH), DMSO 10 %, 1 % de tritón X-100. Los portaobjetos con las muestras

fueron sometidos al proceso de lisis durante 2 horas en completa oscuridad y a una temperatura de 4°C.

■ **Electroforesis:**

Luego la lisis los porta objetos fueron llevados a la cámara de electroforesis la cual contenía un buffer preparado con 1mM EDTA y 300mM NaOH. Para obtener un Ph>13 se debió regular con hidróxido de sodio 1M. Las láminas con las muestras quedaron totalmente cubiertas con el buffer para que la corriente pudiera llegar de forma uniforme a éstas. La electroforesis fue realizada durante 25 minutos con un voltaje de 25 y 300mA.

■ **Neutralización:**

La solución de neutralización fue preparada con 0,4M Tris-base, el Ph fue ajustado a 7,5 con 1M Hcl. El lavado de los portaobjetos en esta etapa consistió en tres lavados cada 5 minutos.

■ **Tinción:**

Se añadió Bromuro de etidio (20 mg/ml) sobre las muestras celulares las cuales debieron permanecer en oscuridad hasta la observación en el microscopio de epifluorescencia. La observación de las muestras se realizó con un filtro de excitación de 480-550 nm y un aumento de 40x.

■ **Conteo celular:**

Se trabajó con tres tipos de células: gaméticas tanto de hembra como de macho, (ovocitos y espermatozoides) y hemocitos. Debido a la estructura y forma cilíndrica de los espermatozoides de *P.purpuratus*, la imagen del cometa presenta un patrón isodiamétrico de la cabeza, diferente a aquella estandarizada con una clara polaridad representada por dos regiones (cabeza y cola), ver Fig. 2, presentada por Lacaze *et al.*, (2010).

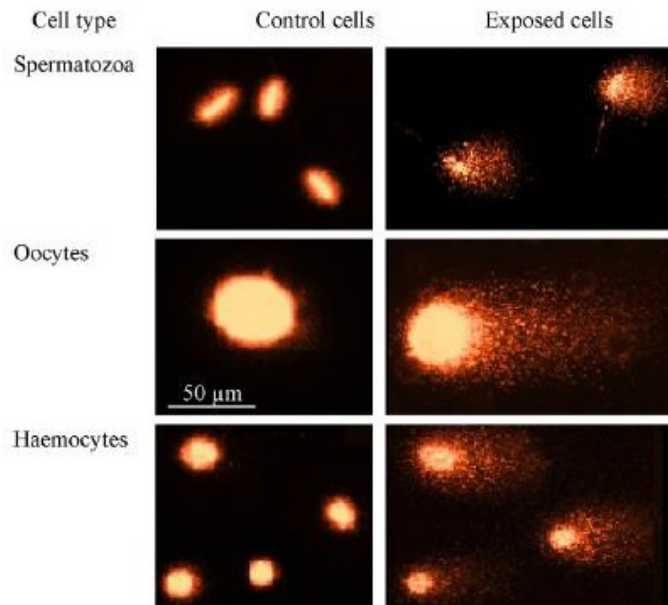


Figura 2: Formas de la migración del ADN para distintos tipos celulares, obtenidos en la investigación realizada por Lacazeet *al*, (2010).

Se utilizó una clasificación visual que consistió en 5 estados con distintos grados de daño, esta clasificación va de 0-4 en donde el estado 0 representa a las células sin ningún tipo de daño y el nivel 4 representa el nivel más alto de éste, dicha clasificación se encuentra relacionada con la longitud (μm) de la cola del cometa, ver tabla 2, tal como lo establece Brugés & Reguero, (2007). Para la evaluación cualitativa del daño se apreció la longitud de la cola del cometa, para esto se utilizó el método estandarizado por Collinset *al*(1995), posteriormente se realizó el conteo total de la muestra (NTM) con la siguiente relación:

$$\begin{aligned}
 \text{NTM} = & (\% \text{ de células en clase 0}) \times 0 + (\% \text{ de células en clase 1}) \times 1 + \\
 & (\% \text{ de células en clase 2}) \times 2 + (\% \text{ de células en clase 3}) \times 3 + \\
 & (\% \text{ de células en clase 4}) \times 4
 \end{aligned}$$

Esta fórmula además de establecer el % de daño en las células individuales también establece el daño total de la muestra a analizar. La clasificación de daño por medio de la fórmula anterior se encuentra en un intervalo de 0 a 400, siendo 0 la ausencia de daño genético y 400 el mayor daño presente en las células.

Tanto los hemocitos, ovocitos y espermatozoides, fueron clasificados en 5 estados para luego de terminar el daño celular en cada uno de los sectores. Los Estados fueron elegidos a partir de los resultados en imágenes del daño celular (Collins *et al.*, 1995; Brugés & Reguero, 2007; Zúñiga, 2009).

Tabla 2: Categorización de los estados del cometa e interpretación del grado de daño genotóxico acorde a la longitud de la cola (Brugés & Reguero, 2007).

Estados	Longitud (μm)	Grado de toxicidad)
0	0-24	No genotóxico
1	25-32	Ligeramente genotóxico
2	33-40	Moderadamente genotóxico
3	41-53	Altamente genotóxico
4	Mayor a 53	Extremadamente genotóxico

6. Resultados

Estados de daño celular: Hemocitos

En figura 3, se muestran los diferentes estados de daño genético de los hemocitos. En el control se observa un hemocito con sus límites bien definidos, mientras que a mayor daño las paredes celulares comienzan a volverse más irregulares (1 y 2). Los estados siguientes (3 y 4) evidencian la formación de la denominada “Cola del Cometa” representada por el aumento de fragmentos de ADN.

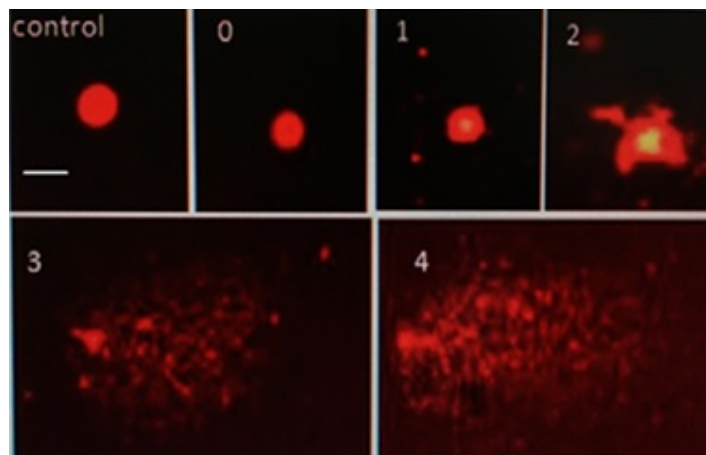


Figura 3: Migración de ADN. Grado 0: ausencia de daño; Grado 1: mínima frecuencia de daño; Grado 2: frecuencia media de daño; Grado 3: frecuencia alta de lesiones; Grado 4: máxima expresión de cola de cometa. Barra 10 μm

Estados de daño celular: Espermatozoides

Se puede observar en la figura 4, que la forma celular del espermatozoide de *P. purpuratus* difiere de la forma de los hemocitos. En los estados avanzados de daño celular (2, 3 y 4) se comienza a notar el desprendimiento de material genético pero esta vez sin la formación de la “Cola del Cometa”.

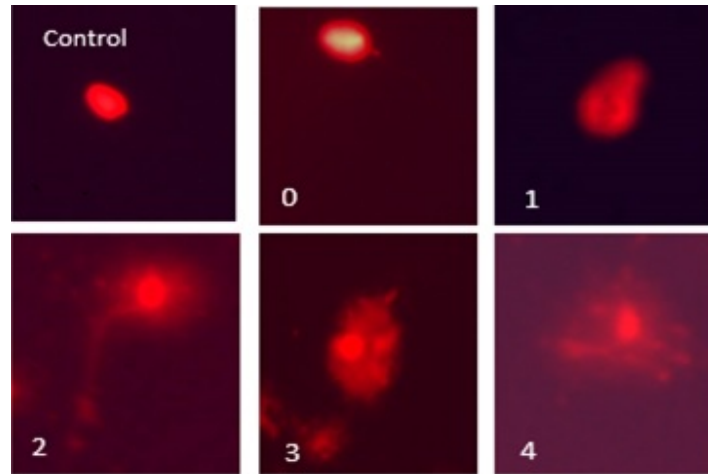


Figura 4: Migración de ADN. Grado 0: ausencia de daño; Grado 1: mínima frecuencia de daño; Grado 2: frecuencia media de daño; Grado 3: frecuencia alta de lesiones; Grado 4: máxima expresión de daño.

Estados de daño celular en Ovocitos

Los estados de daño genético de los Ovocitos son muy similares a los de los hemocitos debido a la forma celular de éstos, ver figura 5. La cabeza del cometa en el último estado de daño (4) se ha reducido considerablemente como consecuencia de la fragmentación y migración del ADN.

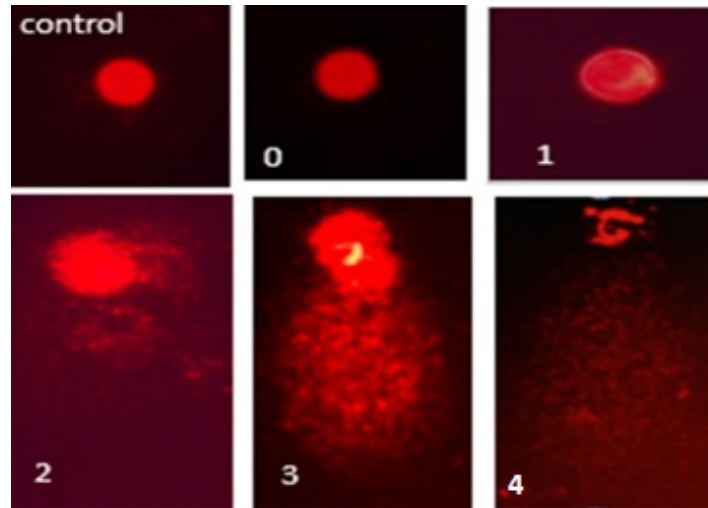


Figura 5: Migración de ADN. Grado 0: ausencia de daño; Grado 1: mínima frecuencia de daño; Grado 2: frecuencia media de daño; Grado 3: frecuencia alta de lesiones; Grado 4: máxima expresión de cola de cometa..

Resultados del estado de genotoxicidad:

Se determinó el daño a nivel celular de los distintos tipos de células con las cuales se trabajó en esta investigación. Se realiza el desarrollo de esta información para contrastar el daño celular por cada tipo de célula con los sectores estudiados. Se observa en la tabla 3, que el mayor daño celular corresponde a los ovocitos específicamente del sector de Montemar.

Tabla 3: Ensayo Cometa. Promedio de frecuencia celular en cada estado (0 al 4) y número total de la muestra.

Sector	tipo de células	Estados de genotoxicidad					
		0	I	II	III	IV	NTM
Quintero	Espermatozoides	93.5 ± 12	550 ± 44.5	88 ± 72	76.5 ± 77	28.5 ± 40	123 ± 33
	Hemocito	19.5 ± 12	50.5 ± 23.3	6 ± 8	1 ± 1	0	82 ± 9
	Ovocito	-	-	-	-	-	-
Ventanas	Espermatozoides	1.5 ± 21	10.5 ± 9	6.5 ± 0	6.5 ± 2	1.5 ± 1	194 ± 62.3
	Hemocito	40 ± 4	54 ± 34	26.5 ± 14.8	14.5 ± 2	3	117 ± 4
	Ovocito	11 ± 7.1	13.5 ± 2	16 ± 2.8	11.5 ± 6.4	5.5 ± 6.4	117 ± 4
Carvallo	Espermatozoides	38.5 ± 39	312 ± 234.7	74.5 ± 81	26 ± 14	6 ± 8.4	122 ± 2.8
	Hemocito	42.8 ± 7.8	181 ± 16.9	35 ± 1	20 ± 9.9	1.5 ± 2	113 ± 10.7
	Ovocito	0	10	5 ± 5.6	3 ± 4	0	167 ± 22
Montemar	Espermatozoides	-	-	-	-	-	-
	Hemocito	16 ± 12.7	15.5 ± 10.6	20.5 ± 6.4	15	14.5 ± 4	197 ± 26.7
	Ovocito	3 ± 1.4	4 ± 1	37 ± 15.6	18.5 ± 5	13.5 ± 9	244 ± 15.6

Número Total de la Muestra Global (NTM):

Se determinó la cantidad global (Espermatozoides+ ovocitos+ hemocitos) de células por estado, para luego obtener el daño global por sector (NTM global), ver tabla 4. Esta información fue desarrollada para obtener la relación entre las concentraciones de los metales (Cu-Pb-Zn) en tejidos por sector y el daño celular. Observándose que es en el sector de Montemar en donde el daño celular (global) es mayor.

Tabla 4: Frecuencia celular global en cada estado (0 al IV) y comparación promedio del conteo total de la muestra global (NTM global). Letras diferentes (a-b) indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Sector	Estado 0	Estado I	Estado II	Estado III	Estado IV	NTM global
Quintero	113	601±21	94±63.6	77.5 ± 76	28.5±40.3	119.6±30.8 ^b
Ventanas	52.5 ±13	78±41	49±17	32.5±6.4	10±7.1	143.8±16.2 ^b
Montemar	19±14.1	19±11.3	57.5±9.2	33.5±4.9	28±12.7	218.5±27.3 ^a
Playa Carvallo	81±46.7	503±217.7	115±88.4	49±0.3	7.5±6.4	120.6±1.7 ^b

Resultados Análisis de metales:

Se observa en la tabla 5, que en todos los sectores la concentración de zinc fue la más alta, <0,06 mg/L. Mientras que las concentraciones de cobre fueron las más bajas en todos los sectores.

Tabla 5: Concentraciones de metales (mg/L) en agua de mar.

Sitios de muestreo	Cu	Pb	Zn
Quintero	<0.01	0.02	<0.06
Ventanas	<0.01	0.04	<0.06
Playa Carvallo	<0.01	<0.02	<0.06
Montemar	<0.01	<0.02	<0.06

Las concentraciones de zinc encontradas en tejido fueron las más altas en todos los sitios de

muestreo, ver tabla 6. En Playa Carvallo se obtuvo la mayor concentración de este metal con 41,99 mg/Kg, el Plomo por su parte fue el metal que se encontró en menor concentración en los tejidos.

Tabla 6: Concentraciones de metales (mg/kg) en tejido corporal completo.

Sitios de muestreo	Cu	Pb	Zn
Quintero	18.88	<0.2	40.81
Ventanas	4.89	<0.2	27.95
Playa Carvallo	4.79	1.65	41.99
Montemar	6.09	0.36	26.22

Regresión simple de metales en tejido

Se presenta en la tabla 7 la correlación de Pearson entre las variables analizadas, metales y número total de la muestra (NTM). Para que se logre establecer una correlación entre variables $P < 0,05$.

Tabla 7: Coeficiente de correlación Pearson entre variables estudiadas.

	Cu	Pb	Zn
Cu	-	-	-
Pb	-0.418*	-	-
Zn	0.478*	0.568*	-
NTM	-0.352*	-0.340*	-0.833*

NTM: Estado de daño total de la muestra celular de *P.purpuratus* por sector. *Valores no significativos con $P > 0,05$.

Masa corporal y longitud

Se observa en la tabla 8 que los individuos de la bahía de Quintero presentan una menor masa corporal y también una menor talla. En la zona de Ventanas se obtuvo el mayor promedio de masa corporal y longitud.

Tabla 8: Promedio de la masa corporal y longitud de *P.purpuratus*.

<i>P. purpuratus</i>	Masa corporal (gr)	Longitud total (cm)
Quintero	2.1 ± 0.6	1.8 ± 0.2
Ventanas	7.5 ± 1	2.7 ± 0.4
Playa Carvallo	4.1 ± 1	2.2 ± 0.2
Montemar	3.2 ± 1	2.1 ± 0.5

7. Discusión

El efecto genotóxico de las aguas costeras se ha manifestado por la exposición de los organismos a diversos contaminantes provenientes de actividades antrópicas. Siendo relevante en la región de Valparaíso la actividad minera. Dada esta situación la utilización de bivalvos filtradores para monitorear la presencia de metales, ha sido una necesidad (Acevedo 2010; Campos 2004; Calderón *et al.*, 2012; Iannacone & Salazar, 2007).

Presencia de cobre, plomo y zinc en tejido corporal

El análisis de los metales evidenció diferencias en la acumulación de estos en el tejido, los resultados revelan que la mayor concentración de Cu se obtuvo en Quintero, superando ampliamente, a aquella encontrada en los organismos de Ventana, siendo similar a lo encontrado por Meléndez, (2013). Respecto al Pb, Quintero y Ventana presentaron la menor concentración de este metal.

Es importante destacar que Playa Carvallo fue utilizado como zonas control por ser un sitio conocido libre de contaminación (Espinoza & Fernández, 2012; Meléndez, 2013) sin embargo, este registró la mayor concentración de Pb y Zn mostrando un incremento al cabo de tres años en la concentración de estos metales, principalmente del zinc.

Quintero y Playa Carvallo son las zonas que presentaron las concentraciones más altas de zinc en tejido, no obstante, en las 4 estaciones predominó la concentración de este metal por sobre los otros analizados. Demostrando que el zinc es el metal más bioacumulable en *P. purpuratus*, estos resultados coinciden ampliamente con el estudio de Campos (2004), el cual utilizó como biomonitor a *Argopecton purpuratus*, mostrando en los análisis de tejido una alta concentración de Zn en comparación con los otros metales analizados. Situación similar ocurre en la investigación realizada por Calderón & Valdés (2012), en donde también fueron analizados Cu, Pb y Zn en organismos bentónicos para evaluar el impacto de la actividad antrópica, en este estudio la concentración de Zn en los tejidos de organismos utilizados

también supera ampliamente a las concentraciones de Cu y Pb.

Análisis de metales en agua

Las concentraciones de metales en el agua de mar fueron contrastadas con la Guía de la CONAMA (2004), para establecer los rangos aceptables de cada una de las estaciones elegidas. Se destaca que las concentraciones de los metales analizados no presentaron grandes variaciones, a pesar de esta situación, en todas las concentraciones de los metales analizados y en todas las estaciones el valor se encuentra en el rango establecido de “clase2” indicado en la Guía CONAMA, lo que se refiere a la buena calidad del agua marina haciéndola apta para el desarrollo de la acuicultura, actividades pesqueras extractivas y para actividades portuarias, navegación, entre otras.

Determinación de la genotoxicidad: Ensayo cometa

El análisis molecular del daño ocurrido a nivel del ADN realizado en los tres tipos celulares hemocitos, espermatozoides y ovocitos mostraron efectos esperados de daño a nivel de las hebras simples y dobles de ADN. Los hemocitos ampliamente utilizados en otras especies de bivalvos (Gomes *et al.* , 2013; Lafarga *et al.* , 2008; Mai *et al.* , 2012; Klobucar *et al.* , 2003; Kolaveric *et al.*, 2013), en el caso de *P. purpuratus*, el volumen celomático obtenido desde el musculo aductor es reducido por lo que se obtiene una baja concentración de hemocitos, consecuencia del pequeño tamaño que presentaron estos organismos, a diferencias de los usados por Meléndez (2013). El uso de espermatozoides y ovocitos como células marcadoras en bivalvos han sido escasamente utilizados, Lacaze *et al* (2010) en *Gammarus fossarum* ha registrado la respuesta genotóxica en células germinales.

Los hemocitos presentaron un menor daño genotóxico comparado con los espermatozoides, de acuerdo a Steiner *et al* (1998) y Lacaze *et al* (2010), la razón de esta situación se encuentra en que los espermatozoides no poseen mecanismos de reparación del ADN, en comparación con los hemocitos que si poseen estos mecanismos por lo que la respuesta de daño suele ser mucho menor.

El análisis entre el número total de la muestra por tipo de células analizadas, puede establecer que en todos los sectores a estudiar el daño fue mucho mayor en células germinales, que en hemocitos. En el caso de los ovocitos que, si presentan mecanismos de reparación de ADN, el daño celular fue mucho mayor que el registrado en hemocitos, al igual que en el caso de los espermatozoides en la mayoría de los sitios estudiados.

En los resultados obtenidos del número total de la muestra global y en base a los estudios de Collins *et al* (1995) y Burgués & Reguero (2007), se logró establecer que el mayor daño celular, se encuentra en los individuos de Montemar, mientras que los individuos que presentaron menor daño a nivel global de sus células fueron los de Quintero. Si bien es cierto que, de acuerdo a estos resultados, los valores encontrados no representan un daño letal, estos son indicadores de alerta temprana.

Al analizar los resultados de correlación entre el NTM y las concentraciones de metales en tejido es posible inferir que no existió correlación entre estos dos parámetros, esto debido a que los metales no sólo presentan respuestas de forma individual, si no también, presentan efectos sinérgicos o antagónicos los cuales pueden presentar respuestas aún más genotóxicas (Cooper *et al.*, 2009; Gaete & Chavez, 2008; Roney & Colman, 2004). Debido a las actividades antrópicas costeras, existe una mayor variedad de metales como Cr, Hg, Fe, etc, en las aguas y también de otros agentes contaminantes como hidrocarburos (fernley *et al.*, 2000; Sadikaj *et al.*, 2010; Lee & Steiner., 2003; Frenzilli *et al.*, 2009) que no fueron analizados y que pueden ser igualmente asimilados por los organismos, potenciando o bien disminuyendo la respuesta genotóxica del Cu, Pb y Zn. En el estudio de Lacaze (2010) un herbicida y un ácido orgánico fueron los compuestos que generaron mayor genotoxicidad en las células germinales de *Gammarus fossarum*, por sobre el efecto generado por el metal analizado, por lo que podríamos establecer que en aquellos sectores en donde hubo un mayor daño en espermatozoides y ovocitos fue por la acción de algún otro agente tóxico derivado de las actividades antrópicas más que por acción directa de los metales analizados.

Factores como la salinidad del medio marino y el pH de éste también pueden influenciar en los resultados obtenidos al igual que las variables intrínsecas del organismo como crecimiento, reproducción etc, factores que no fueron analizados en ésta investigación (Abele *et al.* , 2002; Carvajal, 2012; Ladhar-Chaabouni *et al.*, 2012; Lemus *et al.*, 2013; Vicente, 2010).

8. Conclusión

- Las localidades estudiadas presentan agentes químicos que generan daño genotóxico, existiendo diferencias significativas entre estas, siendo la zona de Montemar la que presentó el mayor daño en el ADN.
- Los tipos celulares presentan diferentes grados de daño genotóxico, siendo los espermatozoides y ovocitos las células más afectadas.
- No hubo correlación entre la respuesta genotóxica y las concentraciones de metales (Cu, Pb, Zn) en tejido.

9. Referencias bibliográficas

1. **ABELE**, D., K. Heise, H.O. Portner & S. Puntarulo. 2002. Temperature- dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. J. Exp. Biol. 205 (13): 1831-1841.
2. **ACEVEDO**, J., Orellana, F., Guiñez, R. 2010. Evaluación experimental de la toxicidad de cobre in situ sobre la fauna asociada a *Perumitylus purpuratus* (Bivalvia; Mytilidae), un ingeniero ecosistémico. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 45(3): 497-505.
3. **ARANGO**, S.S. 2011. Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. Rev. Fac. Nac.Salud Pública. 30(1):75-82.
4. **BAQUEIRO**, E., Borabe, L., Goldaracena, C., Rodríguez J. 2007. Los moluscos y la contaminación: Una revisión. Revista mexicana de biodiversidad. 78:1-7.
5. **BESSER**, J., Leib,K., 2007. Toxicity of metals in water on sediment to aquatic biota. En: Church.S.E; Von-Guerard, P., Finger.S.E. Integrate investigation of environmental effects of historical minning in the Animas River, wathershed, San Juan County, Colorado. 2: 837-850.
6. **BO-MI**, K., Jae-Sung,R., Chang-Bum,J., Soo,S.J., Gyung,S., Young-Mi,L., Jae-Seang,L. 2004. Heavy metals induce oxidative stress and trigger oxidative stress-mediated heat shock protein (hsp) modulation in the intertidal Icopepod *Tigriopus japonicus* . Comparative biochymistry and physiology. Part C.166:65-74.
7. **BRUGÉS**, K and Reguero, M. 2007. Evaluación preliminar de toxicidad genotoxicidad y actividad microbiana de *Sida rhombifolia* L Sida rhombifolia L. Revista colombiana de biotecnología. 9(11): 5-13.

8. **CAFFETTI**, J., Mantovani, M., Pastori, M., Fenocchio, A. 2008. First genotoxicity of Paraná River water from Argentina using cells from the clam *Corbicula fluminea* (*Veneroida corbiculidae*) and chinese hamster (*Cricetulus griseus* Rodentia, Cricetidae) K1 cells in the comet assay. *Genetics and molecular biology*.31 (2):561-565.
9. **CAMPOS**, H. 2004. Cn, Cd, Pb y Zn en aguas, sedimentos y organismos marinos en sectores costeros de la provincia de Arica. *IDESIA Chile I Región*. 22(1):7-19.
10. **CALDERÓN**, C y Valdés, J. 2012. Contenido de metals en sedimentos y organismos bentónicos de la bahía de San Jorge, Antofagasta, Chile. *Biología marina y oceanografía*.47 (1):121-133.
11. **CARES**, Perez & Leny Eunise. 2013. Divergencia genética del mitílido *Perumytilus purpuratus* (Lamarck 1819).Distribuido en el océano pacífico y atlántico del cono sur de Sudamérica. Tesis de grado para optar el grado de Licenciado en Biología Marina y título profesional de Biólogo Marino. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. 64h.
12. **CARMONA** Ortiz, Erico. 2009. Evaluación genotóxica de algunos metales pesados en *Drosophila melanogaster* mediante los ensayos SMART de alas y cometa. Tesis doctoral. Universidad autónoma de Barcelona.169h.
13. **CARRASCO**, R., M., León S., O. Acevedo., Hinojosa, E. 2006 .METALES PESADOS Y BIO-DISPONIBILIDAD.
Disponibile en <http://www.captura.uchile.cl/handle/2250/10776>.
14. **CARVAJAL**Vasquéz, Diana. 2012. 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. Chile. Universidad de Valparaíso.104h.

15. **CASTRO**, M., Sanchez, R., Troncoso, L. 2008. ITS como marcador nuclear de polimorfismo en poblaciones de *Perumytilus purpuratus* . Revista Tumbaga. 3:128-140.
16. **COLLINS**, A.R., Ma, A.G., Duthie, S.J. 1995. The Kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. Mutation Research.336: 69-77.
17. **CONAMA**, 2004. Guía CONAMA para el establecimiento de las normas secundarias de calidad ambiental para aguas continentales superficiales y marinas. Santiago, Chile.
18. **CONAMA**, 2009. Guía para el control y prevención de la contaminación industrial, actividad portuaria. Santiago-Chile. Comisión nacional del medio ambiente.
19. **COOPER**, N.L., Bidwell, J.R., Kumar, A.2009. Toxicity of copper, lead and zinc mixtures to ceriodaphnia dubia and daphnia carinata. Ecotoxicology and environmental safety.72: 1523-1528.
20. **CORNELIS**, R., Borguet, F., De Kimpe, J. 1993. Trace element in medicine. Anal Chim. Acta. 283: 183-189.
21. **COUGHLAN**, B.M., Hartl, M.G.J., O'Reilly, S.J., Sheehan,D., Morthersill, C.,Geffard,O., *et al.*, 2002.Detecting genotoxicity using the comet assay following chronic exposure of Manila clam *Tapes semidecussates* to polluted estuarine sediments. Marine pollution bulletin. 44:1359–1365.
22. **DE VIZCAYA-RUIZ**, A., Barbier, O., Ruiz-Ramos, R., Cebrian, M.E. 2008. Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic. Mutat. Res., inpress,10.1016/j.mrgentox.2008.09.020.
23. **DURUIBE**, J.O., Ogwuegbu, M.O., Egwurugwu, J.N. 2007. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. Intermareal journal of physical sciencies.2 (5):112-118.

24. **EDITEC S.A.** 2012. Primera edición de catastros de centrales y proyectos energéticos. Revista ELECTRICIDAD. Santiago de Chile., 2012.
25. **ESPINOZA**, G.Patricio y Fernandez, D. Daniel. 2012. Evaluación del efecto citotóxico y genotóxico provocado por cobre a través del tiempo de retención del rojo neutro e inducción de micronucleos en el bioindicador *P. purpuratus* . Trabajo de titulación para optar al título de ingeniero ambiental. Universidad de Valparaíso. Chile.
26. **FERNLEY**, P., Moore, M., Lowe, D., Donkin, P., Evans, S. 2000. Impact of the sea empress oil spill on lysosomal stability in mussel blood cells. Marine Environmental Research. 50:451-455.
27. **FLEMING**, CR. 1989. Trace element metabolism in adult patients requiring total parenteral nutrition. Am J Clin Nutr. 49: 573-579.
28. **FRENZILLI** , G., Nigro, M., Lyons, B.P. 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. Mutation Research. 681: 80-92.
29. **GAETE**, H y Chávez, C. 2008. Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1874) (*Cladocera, Crustacea*). Limnetica. 27(1):110.
30. **GOMES**, T., Araújo, O., Pereira, R., Almeida, A., Cravo, A., Bebianno, M. 2013. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis* . 84: 51-9.
31. **GONZÁLEZ**, M. Donaji., Espinoza, G., Ilizaliturri, C., Mejía, J., Jasso, Y., Díaz, F., 2012. Ensayo cometa en fauna terrestre. En: Cuevas Días, M., EspinozaReyes, G., Ilizaliturri Hernandez, C., Mendoza, C. Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos. México. (1): 107-125.

32. **GONZÁLEZ** Francisco. 2014. Análisis valor estratégico de las fundiciones Chilenas. Tesis para optar al grado de magister en Gestión y Dirección de empresas. Santiago. Universidad de Chile.79h.
33. **GOSLING** Elizabeth. 2004. Bivalve Mollusc, Biology, Ecology and Culture. Oxford, UK: Black well Sciencie.
34. **GORE**. 2012. Estrategia Regional de Desarrollo, región de Valparaíso, Chile. Gobierno Regional.
35. **IANNACONE**, J & Salazar, M., 2007 Efectos de mezclas binarias de tres metales pesados sobre larvas *Chiromus calligraphus*Chiromus calligraphus. J. Braz.Soc. Ecotoxicol. 2 (3):211-217.
36. **KAS** ingeniería, Geoaire.2009.Análisis general del impacto económico y social de una norma de emisión para termoeléctricas.
37. **KLOBUCAR**, G., Paulica, M., Erben, R., Papes, D. 2003. Application of the micronucleus and comet assay to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of fresh water enviroments. Aquatic toxicology.64: 15-23.
38. **KOLAVERIC**, S., Knezevic, V. J.,Paunovic, M., Krocun, M., Vasiljevic, B., Tomovic, J., Vukovic, G.B., Gazic, Z. 2013. Monitorig of DNA in haemocytes of freshwater mussel *Sinanodonta woodiana* sample from the Velika Morova River in Serbia with the comet assay. Chemosphere. 97:243- 251.
39. **LACAZE**, E., Geffard, O., Bony, S., Devaux, A. 2010. Genotoxicity assessment in the amhipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet Assay. Mutation Research/ Genetic Toxicology and Enviromental Mutagenesis. 700: 32-38.

40. **LADHAR-CHAABOUNI**, R, M. Machreki – Ajmi & A. Hamza-Chaffai. 2002. Use of Metallothioneins of biomarkers for environmental quality assessment in the Gulf of Gabes (Tunisia). *Environ. Monit. Assess.* 184 (4): 2177-2192.
41. **LAFARGA**, D.F, Valenzuela, B.M., Dupré, E., Del Río, P.M., Gallardo,E. 2008.Genomic integrity evaluation in sperm of *Choromytilus chorus* (Molina,1782) by comet assay. *Gayana*72 (1): 36-44.
42. **LEE**, Richard and Steiner Scott. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation research.* 544: 43-64.
43. **LEMUS**, M., N. Rojas., L.R. Astudillo & K. Chung. 2013. Metalotioninas en *Perna viridis* (Bivalva: Mytilidae): variación estacional y su relación con la biología reproductiva, *Rev. Biol. Trop.* 61(2): 701-709.
44. **MAI**, Huong., Cachot, J., Brune, J., Geffar, O., et al. 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) . *Marine Pollution Bulletin.*2663–2670.
45. **MACREADY**, N. 1998. Zinc Supplements improve children’s health. *Brit Med J.* 317: 369.
46. **MATÉS**, J., Segura, J., Alonso, F., Márquez, J. 2010.Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using Ros-mediated mechanisms. *Free radical biology and medicine.* 49:1328-1341.
47. **MELÉNDEZ**, I. 2013. Evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad de las aguas costeras de la Bahía de Quintero (Chile central) sobre *Perumytilus purpuratus* (Lamarck

1819). Proyecto de Título para optar al título profesional de Ingeniero ambiental Universidad de Valparaíso. Chile.

48. **OSTLING**, O and Johanson, K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 123: 291-298.
49. **OYARZUN**, R., Higuera, P., Lillo, J. 2011. Minería ambiental, una introducción a los impactos y su remediación. España, ediciones GEMM. 337 p.
50. **PANDEY**, G. and Mandhuri, S. 2014. Heavy metals causing toxicity in animals and fishes. *Research journal of animal, veterinary and fishery sciences.* 2(2):17-23.
51. **REIS**, P., Salgado, M., Vasconcelos, V. 2011. Barnacles as biomonitors of metal contamination in coastal waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* 93: 269-278.
52. **RIGONATO**, J; Montovani, M; Jordao, B. 2005. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. *Genetics and molecular biology.* 28(3): 464-468.
53. **ROJAS** Mayorquín and Citlalli M. 2011. Estudios de la contaminación de los recursos hídricos en la cuenca del Río San Pedro, previos a la construcción de hidroeléctrica (P.H Las cruces) en Nayloril, México. Tesis para obtener el Título de Licenciado en Biología. Jalisco, México. Universidad de Guadalajara. 166h.
54. **RONEY**, N and Colman, J. 2004. Interaction profile for lead, manganese, zinc and copper. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 18: 231-234.
55. **ROWE**, L., Degtyareva, N., Doetsch, P. 2008. DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free radical biology and medicine.* 45:1167-1177.

56. **SADIKAJ**, R. Panariti, E., Arapi, D. 2010. Monitoring of toxic in bivalve molluscs along the adriatic coastal line of Albania. *Natura Montenegrina*, Podgorica. 9(3): 321-329.
57. **SALAMANCA**, Marco., Jara B., Rodriguez T. 2004. Niveles de Cu, Pb, Zn en agua y *Perumytilus purpuratus* en bahía San Jorge, Norte de Chile. *Gayana*. 68 (1): 53-62.
58. **SALAZAR** Rivera, Claudia. 2009. Estimación de la generación de cenizas de centrales térmicas a carbón y su reuso en la industria del cemento y hormigón. Proyecto de título para optar al Título Profesional de Ingeniera Ambiental. Santiago de Chile. Universidad Andrés Bello.152h.
59. **SECTRA**. 2010. Diagnóstico del Sistema de cabotaje de carga marítima. Santiago-Chile. Ministerio de planificación y Cooperación.
60. **SRIVASTAVA**, S. S., R. D. Mishra, S. Tripathi, D. Dwivedi & K. Gupta. 2006. Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla certicillata* (L. F.). *Royle Aquatic Toxicology*.80: 405- 415.
61. **STEINER**, S., Streib-Montee,R., Leather,J., Chadwick,D.1998. DNA Damage in Mussels at Sites in San Diego Bay. *Mutation Research*.399: 65-85.
62. **SMA**. Superintendencia de medio ambiente, gobierno de Chile, 2014. Guía de aspectos ambientales relevantes para centrales termoeléctricas.
63. **VALDÉS** Quilodrán, Rodrigo. 2014. Distribución oceánica de metales pesados asociados a la actividad del complejo industrial Ventanas en la bahía de Quintero, V región. Tesis para optar al grado de Licenciado en Geografía. Santiago, Chile. Universidad Academia de humanismo cristiano. 69h.
64. **VALKO**, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. 2006. Free radicals metals and antioxidants in oxidative strees- induced cancer. *Chem. Biol. Interact*. 160: 1-40.

65. **VAN DER WAT**, L. and Forbes, P.B.C. 2015. Lichens as biomonitors for organic air pollutants. *Trends in Analytical Chemistry*. 64:165-172.
66. **VARGAS-ALBORES**, F. AND Barraco, M. 2001. Los Moluscos peptinidos de Ibero América: Ciencias y Acuicultura. A.N. MARTINEZ (ED. 2001. CAP.7: 127-146).
67. **VICENTE** Martorell, Juan José., 2010. Biodisponibilidad de metales pesados en dos ecosistemas acuáticos de la costa Sur Atlántica Andaluza afectados por contaminación difusa. Tesis doctoral. España. Universidad de Cádiz.528h.
68. **WONG**, V., Szeto, Y., Collins, A., Benzie, C. 2005. The comet assay: a biomonitorin tool for nutraceutical research. *Current topics in nutraceutical research* 3(1): 1-14.
69. **ZUÑIGA** Venegas, Liliana A., 2009. Optimización metodológica del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana. Tesis doctoral. España. Universidad Autónoma de Barcelona.223h.

10. Anexos

Etapa de lisis



Figura 6: Etapa de lisis celular. Muestras sumergidas en vaso coplin con solución de electroforesis (Ph: 10).

Etapa de electroforesis

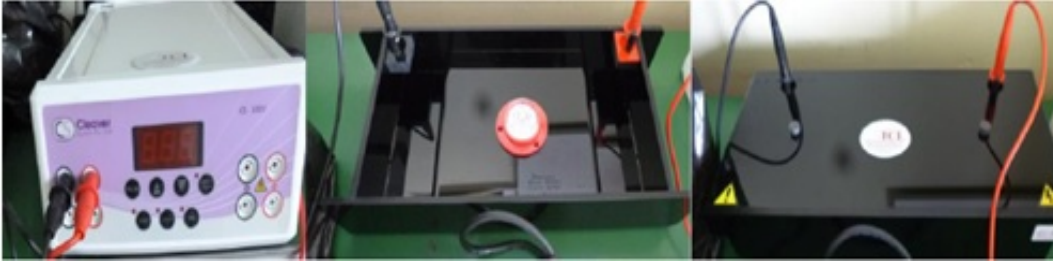


Figura 7: Tanque de electroforesis conectado a fuente de poder.

Etapa de neutralización

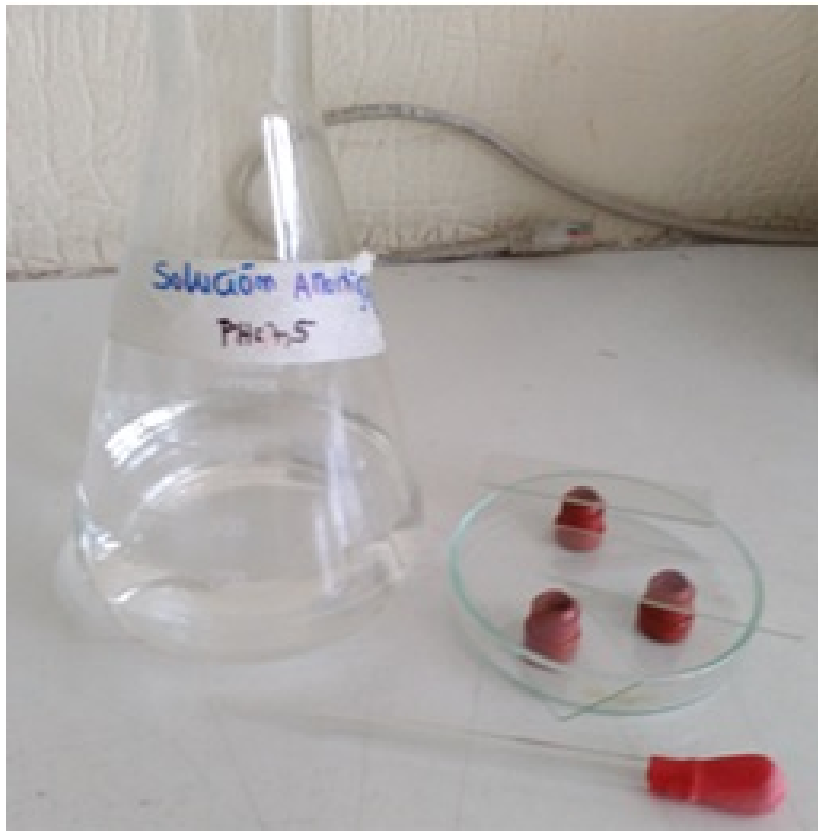


Figura 8: Etapa de neutralización de las muestras. Lavado de muestras con solución amortiguadora (Ph: 7,5).