Biomarcadores de genotoxicidad y estudios de homogeneidad genética en *Heleobia cf. australis* para el análisis ambiental de la costa uruguaya.

Tesina de grado | Licenciatura en Bioquímica

Estudiante: Br. Stefanie Martínez

Tutores: PhD Silvia Villar | MSc. Noelia Kandratavicius

Departamento de Oceanografía y Ecología Marina

Facultad de Ciencias | UdelaR

Montevideo, Uruguay

2017

Agradecimientos

A mis padres,
en primer lugar, sin los cuales no estaría aquí
y no hubiese conocido el mundo que quiero entender y explicar,
y arreglar.

A mi compañero de vida,
por caminar y mirar conmigo en la misma dirección,
por permitirme ser yo misma como con nadie más.

A mi hijo,
por darme la misión más trascendente que tendré jamás,
y hacerme recorrer el viaje más removedor y sanador,
por enseñarme tanto, por su amor incondicional.

A mi familia: hermanos, abuelas, tías…
y a la prestada: suegra, cuñados, sobrinos,
por las risas, las palabras, la ayuda, el apoyo, la logística,
la aceptación, la confianza.

A mis amigas, mis cómplices, mi tribu,
las de siempre, las de ahora, las de toda la vida,
por sus oídos, sus ojos y sus brazos,
por aceptarme,
por confiar en mí y hacer que yo misma lo haga.

A mi terapeuta,
por ayudarme a encontrar mis propias herramientas
para desentrañar un montón de misterios
y así finalmente avanzar.

A mis orientadoras,
por darme la oportunidad,
por ayudarme a descubrir el mundo
real y académico,
por la comprensión, la paciencia y el cuidado.

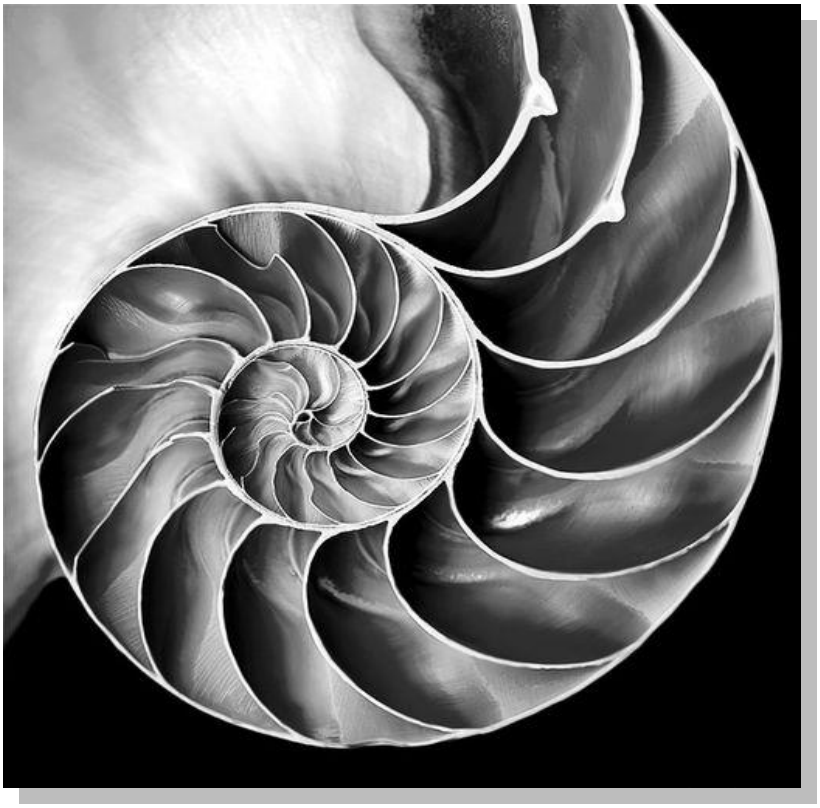
A mis amigos y compañeros de estudio,
por hacer que no me sienta tan sola,
por compartir las dudas, los miedos
y el entusiasmo.

A mi casa de estudios,
y a todas las instituciones y secciones que alguna vez lo fueron,
contribuyendo de alguna manera a toda mi experiencia académica.

"La caracola espera el viento
acostada en la luz del mar:
quiere una voz de color negro
que llene todas las distancias
como el piano del poderío,
como la bocina de dios
para los textos escolares:
quiere que soplen su silencio:
hasta que el mar inmovilice
su amarga insistencia de plomo."

Pablo Neruda

(Caracola - Maremoto, 1970)



Índice de contenidos

1. Resumen 5

2. Introducción 6

2.1. Evaluación del daño genético como herramienta de monitoreo ambiental 7

2.2. Biomarcadores de genotoxicidad 8

2.2.1. Ensayo cometa 9

2.3. Especies centinela 10

2.3.1. *Heleobia cf. australis* 11

3. Hipótesis 12

4. Objetivos 12

4.1. Objetivo general 12

4.2. Objetivos específicos 12

5. Metodología 12

5.1. Área de estudio 12

5.2. Estrategia de muestreo 14

5.3. Procesamiento de las muestras 15

5.4. Identificación molecular de la especie escogida 16

5.5. Ensayo Cometa 17

5.6. Análisis de los datos 18

6. Resultados 19

6.1. Identificación molecular de la especie escogida 19

6.2. Análisis de genotoxicidad y presencia de contaminantes 21

7. Discusión 23

7.1. Identificación molecular de la especie centinela 23

7.2. Análisis de los efectos genotóxicos en *Heleobia australis* en relación a la presencia de contaminantes 24

8. Conclusiones 28

9. Consideraciones finales y perspectivas 28

10. Referencias bibliográficas 29

1. RESUMEN

Las zonas costeras requieren de la implementación de planes continuos de monitoreo ambiental así como de manejo, que tiendan a minimizar las consecuencias de las actividades antrópicas que comprometen el estado de dicho ecosistema. La bahía de Montevideo y otras zonas costeras situadas en el estuario del Río de la Plata, representan un importante recurso ecosistémico para nuestro país resultando prioritaria su adecuada gestión.

El conocimiento de los daños a nivel genético en organismos acuáticos en ecosistemas sometidos a presiones antrópicas ha probado ser una herramienta de detección temprana porque permiten detectar alteraciones en los organismos que los habitan a niveles subletales. El ensayo cometa en células individuales es un biomarcador de genotoxicidad basado en la migración de fragmentos de ADN producidos por agentes mutagénicos.

Los moluscos han sido ampliamente utilizados para monitorear la contaminación en sistemas acuáticos. *Heleobia cf. australis*, es un gasterópodo que se distribuye en casi todos los ecosistemas costeros Uruguayos, incluyendo sitios contaminados.

El presente trabajo buscó relacionar la calidad ambiental de zonas costeras de nuestro país de diferente nivel de impacto, con el estado del genoma de *Heleobia cf. australis* a través del uso de un biomarcador de genotoxicidad como el ensayo cometa. Se partió de la hipótesis de que dicha especie utilizada como centinela ambiental para evaluar la presencia de agentes mutagénicos en ambientes estuarinos, constituye una herramienta suficientemente sensible como para constituir un bioindicador de alerta temprana así como un monitor de seguimiento de ambientes impactados.

Se cuantificó el daño genético a través de dicho biomarcador, para lo cual fueron colectados individuos vivos de *Heleobia cf. australis* en áreas con diferentes niveles de impacto: en la bahía de Montevideo (alto impacto), en la zona costera hacia al Oeste (moderado impacto) y zona costera hacia el Este (bajo impacto).

Las células de organismos de la bahía de Montevideo (área altamente impactada) mostraron niveles de daño genético significativamente mayores que los obtenidos en las zonas de menor impacto. El ensayo cometa como biomarcador de genotoxicidad presentó una respuesta estrechamente vinculada al nivel de impacto ambiental (presencia y nivel de contaminantes) de las áreas de estudio y confirmó que *H. australis* podría ser utilizado como especie centinela para el monitoreo de zonas estuarinas de la costa uruguaya.

Además, mediante análisis filogenéticos se constató que la especie elegida constituye la misma unidad evolutiva para organismos colectados tanto en la bahía de Montevideo como en las zonas costeras hacia el Este y Oeste de la misma, aportando elementos a la controversia taxonómica existente respecto a *H. australis* en nuestro país y confirmando su utilidad como bioindicador ambiental en estudios de genotoxicidad.

Palabras clave: *Ensayo cometa, genotoxicidad, filogenia, gasterópodo, contaminación, estuarios.*

2. INTRODUCCIÓN

Las zonas costeras se caracterizan por ser la unión entre dos sistemas, el sistema natural constituido por los subsistemas físico, químico y biológico y el sistema socio-económico sobre el que se desarrollan determinadas actividades antrópicas sumadas a la infraestructura asociada (Costanza et al, 1997).

El ambiente estuarino es uno de los más comunes en las costas del mundo. Son zonas críticas de transición entre ambientes terrestres y hábitats dulceacuícolas y marinos, y las especies que allí habitan son capaces de desarrollar adaptaciones frente a la constante variabilidad ambiental (Day et al., 1989; Perillo et al., 1999). Los estuarios cumplen funciones ecológicas esenciales: descomposición de detritos y reciclaje de nutrientes, regulación de los flujos de materia y energía del agua, de las partículas y organismos (Knox, 1986).

En los últimos años la integridad ecológica de muchos estuarios y sistemas costeros ha sido afectada por actividades vinculadas al crecimiento de poblaciones humanas y al uso del suelo (Nigro et al., 2006).

La costa uruguaya posee una importante serie de hábitats estuariales que pueden ser categorizados en dos grupos principales, las lagunas costeras y las desembocaduras de ríos y arroyos (Giménez et al., 2005). Dichos estuarios presentan diferentes niveles de impacto ambiental producto del efecto de diferentes actividades antropogénicas.

Dentro de la costa de Montevideo, la bahía de Montevideo representa una de las zonas litorales cuyas actividades asociadas generan un alto impacto ambiental que repercute tanto en la sociedad como en el ecosistema. Situada en el estuario del Río de la Plata; sistema único por su morfología y por el ingreso de agua dulce que influye en la disponibilidad de nutrientes y sujeto a una elevada variabilidad dependiendo de las mareas, los vientos y otros eventos episódicos (Guerrero et al., 1997), la bahía de Montevideo recibe la descarga de efluentes municipales con tratamiento primario (I.M.M., 2016), las descargas de dos arroyos altamente contaminados (Pantanoso y Miguelete) y múltiples descargas industriales incluyendo a la refinería de petróleo ANCAP y la central termoeléctrica Batlle (Danulat et al., 2002; Muniz et al., 2011b; García-Rodríguez et al., 2010; Venturini et al., 2012).

Varios autores han estudiado la calidad ambiental de la costa de Montevideo desde el punto de vista abiótico (Ayup, 1981; François & Risso, 1982; Nagy et al., 1987; Moyano et al., 1993), llegando a la conclusión de que el impacto de las diferentes actividades realizadas dentro de la misma es de carácter localizado. Los estudios biológicos y físico-químicos de esta área permitieron concluir que tanto la bahía, como las zonas adyacentes de Punta Carretas (Este) y Punta Yeguas (Oeste), presentan distinto grado de alteración ambiental debida a la concentración de contaminantes orgánicos como hidrocarburos alifáticos, policíclicos aromáticos y n-alcanos; materia orgánica, y metales pesados como Cromo y Plomo (Gómez-Erache et al., 2001; Danulat et al., 2002; Muniz et al., 2002; 2004a, b; 2005; 2011b; García-Rodríguez et al., 2010; Venturini et al., 2012; 2015). Recientemente, Venturini et al. (2015) evidenció que la bahía de Montevideo y su zona costera adyacente presentan una importante alteración ambiental por la presencia de una mezcla compleja de hidrocarburos alifáticos y policíclicos aromáticos en sedimentos, producto de fuentes de origen natural y antrópico (petrogénico y pirolítico). Además, mediante un enfoque no tradicional con estudios que emplean biomarcadores moleculares, se reveló una contaminación altamente crónica en la bahía debido a la ausencia o tratamiento inadecuado de las aguas residuales y hacia la zona costera adyacente una moderada a baja contaminación (Venturini et. al, 2015). A su vez numerosos estudios en la bahía de Montevideo han determinado un gradiente de contaminación desde la zona

más interna hacia la externa, cuyo descenso continúa en la zonas adyacentes (Danulat et al., 2002; Muniz et al., 2002; 2004a, b; 2005; 2011b; Venturini et al., 2004). Según Venturini et. al (2012) existe además un gradiente espacial claro en el estado trófico bentónico, clasificando la parte interna de la bahía como hiper-eutrófica y la parte externa junto con las áreas costeras adyacentes como eutróficas.

En la zona costera hacia el Oeste de la bahía de Montevideo, la Playa Punta Yeguas fue históricamente considerada una zona de bajo impacto ambiental, sin embargo Muniz et al. (2011b) informó un deterioro de sus condiciones bentónicas posiblemente asociado a un aumento en la descarga de efluentes. A su vez, hacia al Este de la bahía la zona del Arroyo Solís Grande si bien posee bajos niveles de desarrollo urbano (Muniz et al., 2012) existe en ella una fuerte actividad pesquera tanto artesanal como de la flota industrial pesquera durante todo el año (Defeo et. al, 2009) lo que podría explicar los niveles de eutrofización encontrados en su desembocadura por Spósito (2015).

Por otro lado, hacia una zona costera más alejada al Este de Montevideo, el ambiente estuarino de la laguna Garzón fue estudiado por Pita et al. (2017) y clasificado como eutrófico dada su composición bioquímica la mayor parte del año, a pesar de ser una zona con escaso impacto antrópico (Defeo et al., 2009; Muniz et al., 2012).

En la última década, se ha observado un incremento en las actividades antrópicas (aumento de asentamientos, actividad portuaria, ganadería, agricultura entre otros) en la zona de Montevideo (I.M.M., 2016) así como en otras zonas costeras del país, que han comprometido aún más su salud ecosistémica. Esto vuelve imprescindible su monitoreo permanente y la aplicación de planes de manejo que permitan un uso adecuado y sostenible de los recursos acuáticos e ictícolas, así como respecto a la disposición final de efluentes.

2.1. Evaluación del daño genético como herramienta de monitoreo ambiental

La determinación de las variables físico-químicas por métodos analíticos ha sido priorizada históricamente (Livingstone et al., 1992), sin embargo no refleja necesariamente alteraciones específicas en los organismos, en las poblaciones o en las comunidades. En este sentido el monitoreo biológico, hace énfasis en la evaluación de las relaciones causales entre la exposición a contaminantes y los efectos biológicos observados en los organismos expuestos. Entre tales efectos se encuentra el daño en el material genético de un individuo denominándose a todo agente que lo genere: *agente genotóxico.* Las lesiones en el ADN pueden ocurrir directamente sobre la hebra o indirectamente, afectando sistemas de reparación, vías metabólicas o cambios epigenéticos (Hartmann et al., 2003). Por ese motivo, determinar la magnitud del daño en el ADN de organismos centinela resulta de particular interés, porque la contaminación puede alterar a las poblaciones a través de una disminución en su viabilidad o capacidad reproductiva, provocando cambios en la composición de la biota en ecosistemas contaminados. Los contaminantes como metales pesados e hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) y alifáticos (HAs) reportados en la zona de estudio por diversos estudios (Gómez-Erache et al, 2001; Muniz et al., 2002; 2004a; b; 2011a; Venturini et al., 2004; 2015) pueden causar graves alteraciones a nivel molecular y daños subletales que se acumulan en los organismos marinos con efectos a largo plazo modificando la estructura de las comunidades que la habitan (Trannum et al., 2004; Walker, 2009; Sarkar et al., 2014;).

La detección temprana de efectos mutagénicos provocados por diversos contaminantes permite establecer pautas de manejo adecuadas que tiendan a restaurar el equilibrio ecosistémico (Mudry & Carballo, 2006). El uso de las respuestas biológicas al estrés (biomarcadores) en especies centinela ha tenido muy buenos resultados en

evaluaciones de calidad ambiental en los últimos tiempos (Clement et al., 2004; Morgado & Bebianno, 2005; Nigro et al., 2006; Machella et al., 2006; Villela et al., 2006; 2007; Emmanouil et al., 2007; Grazeffe et al., 2008; Yin et al., 2009; Betancur et al., 2009).

2.2. Biomarcadores de genotoxicidad

El término biomarcador se utiliza generalmente en un sentido amplio para incluir casi cualquier medida que refleje una interacción entre un sistema biológico y un peligro potencial, ya sea químico, físico o biológico (WHO-IPCS, 1993). Una situación de estrés causada por contaminantes normalmente desencadena una cascada de respuestas, cada una de las cuales puede, en teoría, servir como biomarcador (McCarthy et al., 1991). Por encima de un cierto umbral (en la dosis o tiempo de exposición al contaminante) las señales del biomarcador que responden a los contaminantes se desvían del rango de una situación no estresante, lo que finalmente conduce a la manifestación de una situación con múltiples efectos a niveles jerárquicos superiores de organización biológica (den Besten & Munawar, 2005).

Cuando se hacen visibles los efectos deletéreos en las poblaciones o en las comunidades, el proceso ya ha avanzado a niveles que requieren de medidas correctivas muy costosas, en otros casos, el ecosistema se encuentra tan alterado que su restablecimiento ya no es una opción. El orden secuencial de las respuestas al estrés por contaminantes dentro de un sistema biológico, desde el nivel molecular hasta el ecosistémico (Bayne et al., 1985) ha generado muchas investigaciones para establecer señales de alerta temprana que reflejan las respuestas biológicas adversas hacia las toxinas ambientales antropogénicas (Bucheli & Fent, 1995). Dado el actual conocimiento de los diferentes mecanismos de acción de los contaminantes, varios biomarcadores pueden reflejar diferentes aspectos moleculares; algunos ejemplos utilizados actualmente para monitorear la calidad del medio acuático, implican enzimas y productos de la biotransformación de fase I y II; seguimiento de parámetros de estrés oxidativo; inducción de proteínas de estrés, metalotioneínas y resistencia multixenobiótica así como estudio de parámetros hematológicos, inmunológicos, reproductivos, endócrinos, neuromusculares, fisiológicos, morfológicos o genéticos (den Besten & Munawar, 2005).

Dentro de la serie de eventos desencadenados debidos a la exposición a un contaminante genotóxico (formación de alteraciones estructurales en el ADN, procesamiento del daño del ADN y posterior expresión en productos genéticos mutantes y expresión de enfermedad), existen algunos que pueden ser detectados y cuantificados para ser utilizados como biomarcadores de exposición y efecto (Dunn, 1991). Los aductos de ADN son productos de adición unidos covalentemente formados cuando especies químicas electrofílicas atacan los sitios nucleofílicos en el ADN, y extensos datos experimentales apoyan su papel en el inicio de la carcinogénesis química (Miller & Miller, 1981). El estudio de éstos, en modelos humanos y animales ha sido una parte importante de la investigación sobre los mecanismos de los trastornos genéticos y en la evaluación de sustancias para establecer su potencial mutagénico.

De las técnicas actualmente disponibles para la detección de modificaciones de ADN, el ensayo ^{32}P-post-marcado (Gupta et al., 1982) parece ofrecer un potencial para el análisis cualitativo y cuantitativo de estos aductos. Sin embargo, esta técnica es un ensayo costoso y consume mucho tiempo. Un enfoque más general implica la detección de rupturas de la cadena de ADN que se producen, ya sea directamente por el producto químico tóxico

(o su metabolito) o por el procesamiento del daño estructural (Shugart et al., 1992). La rotura de la hebra de ADN ha sido considerada como uno de varios indicadores sensibles de genotoxicidad (Mitchelmore & Chipman, 1998). La medición de este daño como un parámetro genético representa un medio para detectar el efecto de una amplia gama de agentes genotóxicos. Hasta la fecha, los métodos más comúnmente utilizados para la determinación del daño al ADN son aquellos que implican elución y el desenrollado alcalino, aunque en la última década el uso del ensayo de micronúcleos y la electroforesis en gel de células individuales en su versión alcalina (SCGE por sus siglas en inglés) o ensayo "cometa" se ha impuesto ante otros marcadores (Large et al., 2002, Hamoutene et al., 2002).

2.2.1. Ensayo Cometa

El ensayo cometa o la electroforesis en gel de células individuales, es un método muy sensible para detectar daño a nivel del ADN de células específicas. Surge de la combinación de técnicas bioquímicas para detectar lesiones en el ADN con la aproximación celular típica de los estudios genéticos. Cuando se observa en microscopio de epifluorescencia una célula, esta tiene la apariencia de un cometa, con una cabeza correspondiente a ADN intacto y una cola, que consiste en ADN dañado, de ahí el nombre de la técnica (Hartmann et al., 2003). El ensayo cometa está basado en la migración de fragmentos o loops de ADN negativamente cargados, a través de un gel de agarosa en respuesta a la acción de un campo eléctrico. La extensión de la migración de dicho ADN, así como la acumulación de material genético en cometas de "cola corta", depende directamente del tipo de daño presente en las células. En este sentido, el tamaño y la forma del cometa así como la distribución del ADN dentro del mismo se relacionan con la extensión y la naturaleza que el agente, o la mezcla de éstos, producen. Existen varias versiones del ensayo, sin embargo, la versión alcalina (pH >13) (Singh et al., 1988) es la que permite detectar el espectro más amplio de daño del ADN (rupturas doble y simple, sitios alcalino-lábiles, crosslinks de ADN–ADN y ADN–proteína). Este ensayo puede aplicarse a cualquier tejido *in vivo*, con células que estén o no en división, lo que le confiere una especial ventaja sobre los métodos clásicos de evaluación de genotoxicidad como el de aberraciones cromosómicas, que requiere división celular (Collins et al., 1997).

Por otra parte, el ensayo cometa es una herramienta valiosa en la investigación básica y no sólo para analizar la acción mutagénica de los compuestos, sino también el proceso de reparación del ADN (Azqueta & Collins, 2013).

La evaluación del daño puede estar medida por software o se puede realizar una búsqueda visual clasificando el daño en niveles que van desde cero a cuatro. La ventaja del uso de software se relaciona con la independencia que confiere en la medida de diversos parámetros respecto a cualquier subjetividad del investigador, así como la vinculación del nivel medio de varios parámetros con la acción de mutágenos específicos. Algunos de los parámetros más relevantes que devuelven los programas informáticos una vez cargadas las imágenes obtenidas de las muestras, son: el porcentaje de ADN en la cola del cometa (Tail DNA %) el cual expresa la cantidad relativa de ADN dañado, y el momento de la cola del cometa Olive (Tail moment Olive) que provee una estimación del daño en el ADN y permite detectar daño genético de diferente origen, definido como el producto del porcentaje del ADN en el cometa y la media de la distancia entre la cabeza y la posición de la cola (Olive et al., 1990; 2005) teniendo en cuenta tamaño y número de fragmentos de ADN dañado.

Las principales ventajas del ensayo cometa sobre los métodos clásicos de evaluación de genotoxicidad son:

- La recolección de datos a nivel de células individuales, permitiendo la aplicación de estadística tanto paramétrica como no paramétrica.
- Necesidad de poca cantidad de células por muestra (menos de 10.000).
- Sensibilidad para detectar daño en la molécula de ADN de diversa índole.
- Aplicabilidad en cualquier población de células eucariotas tanto *in vivo* como *in vitro*, incluyendo células de poblaciones humanas expuestas, organismos terrestres o acuáticos para estudios eco-genotoxicológicos y monitoreo ambiental (Mudry & Carballo, 2006).

Este test se ha utilizado en ensayos genotóxicos, ecotoxicológicos y en estudios de biomonitoreo ambiental (Clement et al., 2004; Machella et al., 2006; Nigro et al., 2006; Emmanouil et al., 2007; Grazeffe et al., 2008; Kumar et al., 2010; Slobodskova et al., 2010; Mhoanty et al., 2011; Parolini et al., 2011; Capriglione et al., 2011; Villar et al., 2015). También ha sido exitosamente utilizado en células vegetales bajo condiciones de laboratorio (Chakraborty et al., 2009).

2.3. Especies centinela

Según Stahl (1997), una especie centinela es todo organismo con respuestas endógenas frente a un factor determinado que provee una señal de alerta temprana sobre potenciales riesgos para la salud de los ecosistemas. Esto permite evaluar la presencia y acción de contaminantes en el medio en el que la especie vive, convirtiéndola en un bioindicador ambiental y se entiende que los resultados obtenidos son hasta cierto punto extrapolables a la especie humana (Aguirre & Tabor, 2004; den Besten & Munawar, 2005; Bischoff et al., 2010; Fernández-Tajes et al., 2011).

Los centinelas pueden ser plantas, invertebrados, peces, reptiles, aves o inclusive mamíferos. Los criterios para su selección son:

- Conocimiento de su biología, fisiología, historia de vida y hábitos.
- Amplia distribución geográfica.
- Alta disponibilidad y abundancia.
- Estabilidad genética y uniformidad en los ensayos.
- Organismos autóctonos o exóticos adaptados, representativos del ecosistema que se evalúa.
- Individuos de ambos sexos con su ciclo de vida completo desarrollado en el lugar.
- Sensibilidad a la contaminación.
- Disponibilidad de ejemplares a lo largo de todo el año.
- Preferencia por especies de importancia recreativa, comercial y/o ecológica, de tamaño reducido (Rossi et al., 2016).

Son muchas las especies que pueden ser utilizadas como indicadores ambientales acuáticos, entre ellos los invertebrados bentónicos que constituyen un importante componente de los ecosistemas marinos, juegan roles vitales en la descomposición de detritos, ciclo de nutrientes y flujos de energía a niveles tróficos superiores. Además, la fauna bentónica vive en estrecha asociación con el sustrato, donde los contaminantes tienden a acumularse (Hyland et al., 2005), por lo que la alteración del mismo puede afectar dichas comunidades, incluyendo su supervivencia (Burone et al., 2003; Magni et al., 2005) entre otras consecuencias, volviéndolos adecuados

indicadores de la existencia de disturbios en estos ecosistemas (Gray et al., 1990). Según Dauer (1993) al exhibir diferentes tolerancias al estrés permiten monitorear de manera confiable la calidad del ambiente. Dentro del bentos, la macrofauna es utilizada para describir cambios ambientales debido a que son organismos relativamente sedentarios y tienen ciclos de vida largos (Thouzeau et al., 1991). En particular el uso de moluscos como especies centinela se ha convertido en una herramienta de interés para evaluar calidad ambiental (Hamoutene et al., 2002; Taban et al., 2004; Slobodskova et al., 2010; Parolini et al., 2011). Hasta hace unos años, se carecía de antecedentes en estudios genotóxicos *in vivo* para gasterópodos estuarino/marinos a nivel nacional. Sin embargo, recientemente se han realizado estudios de biomonitoreo utilizando marcadores de genotoxicidad en sistemas acuáticos que demuestran que algunos moluscos y en particular *Heleobia cf. australis* (d'Orbigny, 1835), resultan ser adecuados como especies centinela para evaluar la calidad ambiental de ambientes estuarinos (Villar et al., 2015).

2.3.1. *Heleobia cf. australis*

La elección del gasterópodo *Heleobia cf. australis* como modelo para biomonitoreo ambiental de sustancias contaminantes con efectos mutagénicos, responde al hecho de que los invertebrados representan más del 90% de las especies acuáticas. El phylum Mollusca al que pertenece *H. cf australis* presenta el mayor número de especies después de los artrópodos y a su vez el 80% de los moluscos está representado por gasterópodos (Seed, 1983; Barnes et al., 1995). Existen antecedentes del uso de caracoles dulceacuícolas (*Biomphalaria glabrata*) en estudios de genotoxicidad *in vitro*, en los cuales se determinaron efectos tóxicos sobre el desarrollo embrionario y la mutagenicidad de células germinales (Grazeffe et al., 2008). Además varios autores han utilizado en sus investigaciones gasterópodos de la familia *Hydrobiidae* (*Hydrobia acuta*, *Hydrobia ulvae*, *Hydrobia ventrosa* y *Heleobia australis*) encontrado alteraciones en la estructura y dinámica de las poblaciones, ciclo de vida, producción, reproducción y crecimiento en respuesta a cambios bióticos y abióticos en ecosistemas costeros de áreas templadas y tropicales (Grazeffe et al., 2008). La distribución de la especie escogida para el presente estudio abarca casi todos los ecosistemas costeros del litoral uruguayo y su presencia es dominante en sedimentos altamente impactados. Además, posee amplia distribución regional, en sistemas estuarinos, encontrándose desde el sur de Brasil hasta la provincia de Buenos Aires, en casi todas las lagunas costeras y sub-estuarios de la región (Muniz et al., 2002; Muniz et al., 2015; Venturini et al., 2004). Dado que existe controversia (Cazzaniga, 2011) sobre la homogeneidad específica de *H. cf. australis* es importante garantizar que los individuos utilizados provenientes de las diferentes zonas de estudio, pertenecen a la misma línea evolutiva. Para ésto son necesarios los análisis filogenéticos correspondientes que pongan en evidencia el nivel taxonómico de la especie involucrada. Por otro lado, existen antecedentes de la aplicación del ensayo cometa en *H. cf. australis* y de su validación con un mutágeno conocido (concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno en análisis *in vitro*), en los que se hallaron diferencias estadísticamente significativas en el nivel del daño en el ADN entre sitios impactados y controles (Villar et al., 2015).

3. HIPÓTESIS

En el presente estudio se partirá de la hipótesis de que la aplicación del ensayo cometa en *Heleobia cf. australis* es lo suficientemente sensible como para distinguir diferentes niveles de contaminación (sitios) en la evaluación del ambiente estuarino. Además, se parte del supuesto de que los organismos colectados en los diferentes sitios presentan homogeneidad genética y por tanto pertenecen a la misma unidad evolutiva.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

El objetivo del presente estudio será analizar los efectos genotóxicos de sustancias contaminantes presentes en distintas zonas costeras del Uruguay, utilizando como biomarcador de genotoxicidad el ensayo cometa, en el gasterópodo *Heleobia cf. australis* como especie centinela para biomonitoreo ambiental.

4.2. Objetivos específicos

1) Confirmar a través del uso de un marcador de variabilidad genética que los organismos colectados en los diferentes sitios pertenecen a la misma unidad evolutiva.

2) Evaluar los efectos genotóxicos en *Heleobia cf. australis* por la presencia de contaminantes en sitios con diferente nivel de impacto.

3) Establecer la utilidad de *Heleobia cf. australis* como especie centinela para evaluar la calidad ambiental de la Bahía de Montevideo y los sitios de muestreo definidos al Este y Oeste de la misma.

5. METODOLOGÍA

La estrategia de investigación siguió las ideas sobre biomonitoreo ambiental y estudios genotóxicos que se han desarrollado en los últimos años (Clement et al., 2004, Machella et al., 2006, Emmanouil et al., 2007, Grazeffe et al., 2008).

Las muestras utilizadas corresponden al Proyecto CSIC, Iniciación a la Investigación: *Aplicación de biomarcadores genotóxicos en moluscos para el monitoreo de la costa uruguaya*, responsable MSc. Noelia Kandratavicius del cual se procesaron las muestras correspondientes a la campaña de invierno.

5.1. Área de estudio

A lo largo de la costa uruguaya existen estuarios con diferentes niveles de impacto antrópico.

La zona costera de Montevideo (34°50' - 34°56' S y 56 °05' - 56°25' W) se encuentra en el centro de la costa del Río de la Plata, estuario micromareal contenido en la segunda cuenca más grande de América del Sur, cuya hidrodinámica está controlada principalmente por forzamiento del viento y caudal fluvial (O'Connor, 1991; Guerrero et al., 1997). Dentro de la misma se distingue la bahía de Montevideo y una zona costera Oeste (desde la

Playa del Cerro hasta Playa Pascual). Desde Montevideo hacia el Este de nuestro país se distinguen diferentes estuarios entre ellos el arroyo Solís Grande y la laguna Garzón.
A continuación se detallan las características de los distintos sitios elegidos:

Bahía de Montevideo

La bahía de Montevideo, cubre un área de aproximadamente 10 km^2 (34°52'-34°56 'S y 56°10'-56°15' W) con una profundidad de agua que llega a 5 m excepto en los canales de navegación (9 – 11 m de profundidad). El Puerto de Montevideo, el más grande de Uruguay, está ubicado al SE en el interior la bahía y está rodeado por una ciudad de 1,5 millones de habitantes. (Danulat et al., 2002). La refinería nacional de petróleo ANCAP, la central termoeléctrica Batlle, así como otras industrias (curtiembres, pinturerías) se encuentran hacia el SW dentro de la bahía. Hacia el interior de la bahía desembocan los arroyos Miguelete y Pantanoso, y el arroyo Seco que descarga mediante una tubería artificial. Estos arroyos transportan desechos de muchas industrias diferentes, centros urbanos y de un gran número de tuberías de aguas residuales (Venturini et al., 2015). Además dos de éstos se encuentran altamente contaminados (Miguelete y Pantanoso) (I.M.M., 2009). Según Muniz et al. (2002) la parte interna de la bahía de Montevideo tiene una mayor heterogeneidad de los sedimentos, mayor carga orgánica y menor contenido de oxígeno en los sedimentos del fondo que los de la parte más externa de la bahía y la zona costera adyacente, y se encuentra altamente contaminada por metales pesados como Cromo, Plomo e hidrocarburos de petróleo. Danulat et al. (2002) definió el puerto de Montevideo como un sistema hiper-eutrófico, que recibe considerables nutrientes y cargas orgánicas. Gómez-Erache et al. (2001) informó que la calidad del agua de la bahía de Montevideo está muy deteriorada debido a varias fuentes puntuales y no puntuales, mientras que las actividades portuarias introducen grandes cantidades de metales pesados y nutrientes que conducen a una alta demanda biológica de oxígeno. Recientemente, Venturini et al. (2015) reveló que la bahía de Montevideo y sus partes externas presentan contaminación crónica por la ocurrencia de hidrocarburos derivados del petróleo crudo y la combustión del mismo.

Zona Costera Oeste

En la zona costera Oeste de Montevideo se encuentra la playa Punta Yeguas (34°53′ S, 56°18′ W) considerada antiguamente una zona de baja contaminación y en dónde actualmente el gobierno municipal planea construir un emisario submarino de características similares al ubicado al Este, en la zona de Punta Carretas, para descargar las aguas residuales provenientes de la parte Oeste de la ciudad que actualmente es descargada directamente a la bahía de Montevideo (Muniz et al., 2004b). Muniz et al. (2011b) clasificó la zona de Punta Yeguas como eutrófica e informó un deterioro de sus condiciones bentónicas probablemente debido al aumento en la eliminación de efluentes no tratados en la parte costera de la zona Oeste de Montevideo.

Zona Costera Este

La cuenca del Arroyo Solís Grande es de aproximadamente 1409 km^2 y su desembocadura (34°47’ S, 55°33’ W) se encuentra a aproximadamente 80 km al Este de la ciudad de Montevideo, en el límite entre los departamentos de Canelones y Maldonado. Su tramo final se encuentra influenciado por el Río de la Plata lo que le proporciona una región estuarial con gradientes de salinidad y temperatura (Gómez-Erache et al., 2000). Esta zona posee bajos

niveles de desarrollo urbano, actividades turísticas y extracción de arena (Muniz et al., 2012), sin embargo operan principalmente puertos artesanales así como la actividad de la flota industrial pesquera durante todo el año, lo que sugiere una elevada presión de los recursos (Defeo et. al, 2009). Según Spósito (2015) su desembocadura presenta un estado trófico mayoritariamente meso-oligotrófico en su compartimiento bentónico, a la vez que un estado ecológico mayoritariamente bueno.

Zona Costera Este – Laguna Garzón

La laguna Garzón (34°46' S, 54°34' W) se ubica a aproximadamente 166 km al Este de la ciudad de Montevideo sobre la costa Atlántica de nuestro país, en el límite de entre los departamentos de Maldonado y Rocha. Esta laguna somera de 1,5 m de profundidad presenta 18 km de espejo de agua y una cuenca de 695 km^2 (Defeo et al., 2009). Conforma un ambiente estuarino complejo con considerable importancia ecológica y económica donde se desarrollan diversas actividades como pesca artesanal, recreación y turismo, entre otros (Pita et al, 2017). Es una zona con escaso impacto antropogénico (Defeo et al., 2009; Muniz et al., 2012) y actualmente integra el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) del Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, en la categoría "Área de Manejo de Hábitats y/o Especies". Sin embargo, Pita et al. (2017) lo clasificó como un ambiente eutrófico la mayor parte del año tanto en sus regiones internas como externas.

5.2. Estrategia de muestreo

La extracción de organismos se realizó en la bahía de Montevideo (BM) y zonas hacia el Este (Arroyo Solís Grande y laguna Garzón) y Oeste de la misma (Punta Yeguas), el muestreo buscó representar zonas con diferentes niveles de impacto determinadas en base a los antecedentes del área de estudio respecto al grado de contaminación. En tal sentido se definieron los siguientes puntos de muestreo (Figura 1):

- Parte interna de la BM zona elegida por su alto impacto: BI
- Parte externa de la BM cuyo impacto es moderado-alto: BE
- Zona costera hacia el Oeste de la BM con moderado-bajo impacto: O
- Zona costera hacia el Este de la BM con bajo-escaso impacto (desembocadura del arroyo Solís Grande y laguna Garzón): E y G.

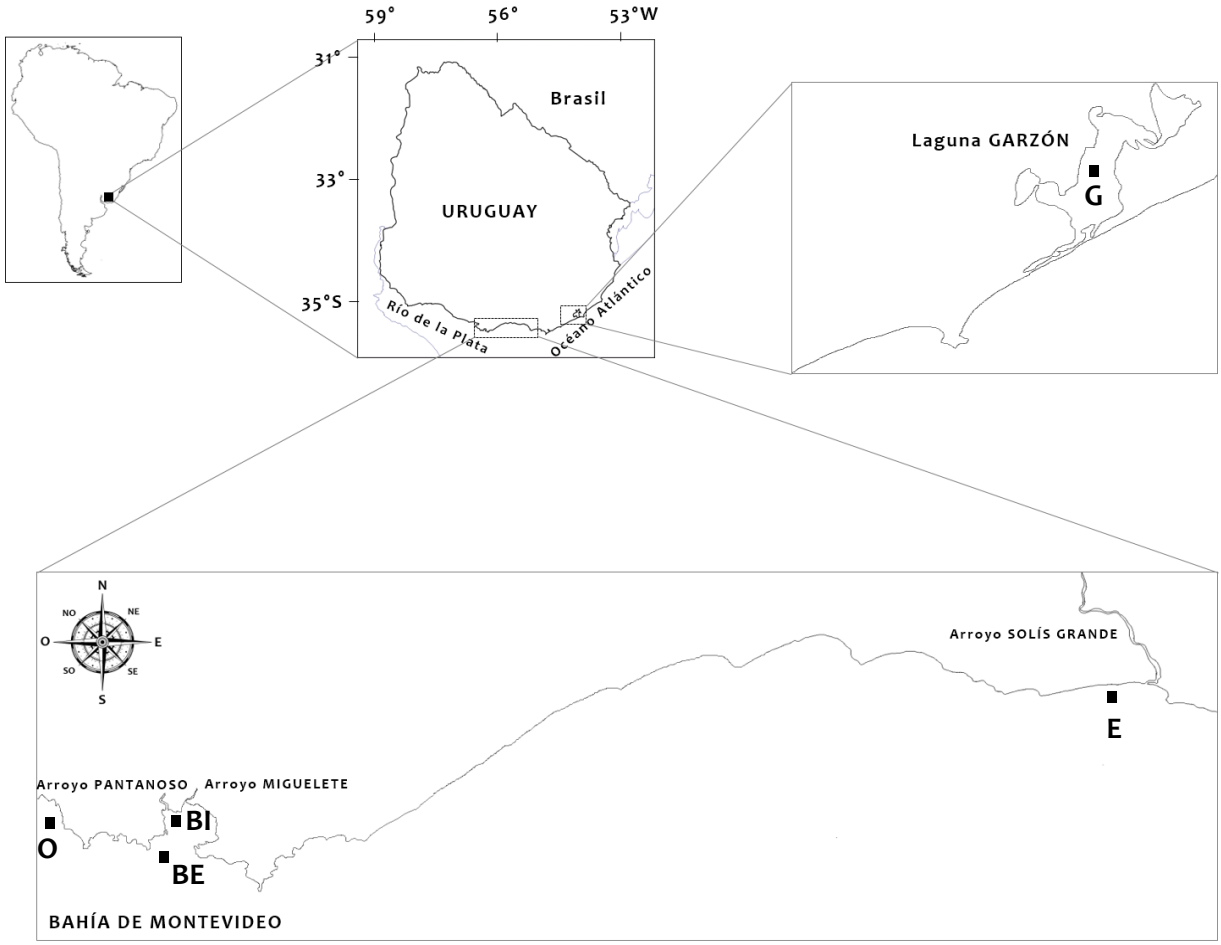


Figura 1. Área de estudio y estaciones de muestreo.

5.3. Procesamiento de muestras

El material biológico se colectó con una draga tipo van Veen de 0,05 m^2, a bordo de la embarcación se tamizaron con una malla de 0,5 mm y los organismos recuperados se colocaron en bolsas con agua del lugar para mantenerlos vivos hasta llegar al laboratorio (70 individuos por sitio). Una vez en el laboratorio se mantuvieron en peceras con agua del lugar de colecta y oxigenadores. Su procesamiento fue inmediato para evitar que ocurrieran procesos de reparación obteniendo células para el ensayo cometa a partir de hemolinfa.

Se procedió a extraer y conservar las muestras según lo descripto en el protocolo de extracción de muestras para análisis de genotoxicidad (Tice et al., 1999). Se maceraron 10 o más individuos de *H. cf australis* (la cantidad dependió del tamaño de los organismos) en una solución de tripsina y PBS (0.1%), para romper las uniones celulares. Se recogió la hemolinfa obtenida con pipeta Pasteur, se realizó su filtración en tubos eppendorf con filtros de malla de tela y se colocó el elutriado en tubos Eppendorf; con solución salina de Kenny (pH 7,5) para hemolinfa (Henshel et. al., 1999). Para los análisis de genética poblacional, se utilizó macerado total sin filtrar en alcohol absoluto frío. Se rotularon todos los tubos con código indicando el sitio de muestreo. Una vez finalizada la obtención de tejido, se almacenaron a -20 °C los tubos destinados la identificación molecular de la especie a estudiar. Para análisis de genotoxicidad se colocaron 50 µL de DMSO en cada tubo con rapidez e inmediatamente se almacenaron también a - 20°C y luego a -80°C.

5.4. Identificación molecular de la especie escogida

El ADN se extrajo según protocolo de extracción de ADN con cloruro de sodio (Miller et al, 1988). Al tejido obtenido en la maceración se le adicionaron 500 µL de buffer de lisis y 5 µL de proteinasa K (20 mg/mL) para luego agitarse en Vortex. Se incubaron los tubos por 2 horas a 55 °C en baño con agitación hasta desintegración del tejido. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugaron durante 15 minutos al máximo de velocidad (15000 rpm aproximadamente). Se transfirieron 500 µL a otros tubos y se le agregaron 300 µL de NaCl 5 M. Éstos se volvieron a centrifugar durante 15 minutos al máximo de velocidad. 500 µL del sobrenadante obtenido fue transferido a otros tubos a los cuales se les adicionó 1 mL de etanol (almacenado a -20 °C) e invirtiéndolos suavemente repetidas veces. Estos fueron rotulados con el sitio de muestreo correspondiente y se dejó durante toda la noche a -20 °C para una completa precipitación del ADN. Transcurrido este tiempo se volvieron a centrifugar los tubos para formar el pellet de ADN, durante 15 minutos al máximo de velocidad. Los sobrenadantes fueron volcados con la precaución de que no se desprendiera el pellet ubicado en el fondo del tubo. Se utilizó papel absorbente para sacar la mayor cantidad de líquido. Los pellets obtenidos se lavaron con 750 µL de etanol al 70 % y se dejaron secar los tubos abiertos a 37 °C por 2 horas aproximadamente. Finalmente, se adicionaron 100 µL de buffer 1X TE y se almacenaron los tubos a 4 °C de 2 a 4 días para luego almacenarlos a -20 °C.

Se amplificó un segmento de la enzima citocromo oxidasa I (COI) mediante reacciones de PCR utilizando cebadores descritos por Folmer et al. (1994). Las condiciones de reacción y ciclado se especifican en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Concentraciones y volúmenes de los reactivos utilizados en las reacciones de PCR.

Reactivo	Concentración stock	Concentración final	Volmen (µl)
Buffer de PCR (1X)	10	1,00	3,00
$MgCl_2$ (mM)	50	2,00	1,20
dNTPs (mM)	10	0,20	0,60
Oligo HaCOI-F (µM)	10	0,30	0,90
Oligo HaCOI-R (µM)	10	0,30	0,90
Taq Pol (U/µl)	5	1,50	0,30
H_2O	-	-	c.s.p. 30

Tabla 2. Condiciones de ciclado para las reacciones de PCR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	3'	-
Desnaturalización	94	1'	35
Hibridación	50	1'	
Extensión	72	1'	
Extensión final	72	3'	-

Para la visualización de los productos de PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% utilizando buffer TAE (Tris, Acetato, EDTA) 1X a pH 8. Como marcador de peso molecular se empleó GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific ™) (Figura 2). Las corridas electroforéticas se realizaron a 100 V durante 30 minutos. Se utilizó GoodView ™ como colorante de ácidos nucleicos, alternativo al bromuro de etidio y se observó en transiluminador de luz ultravioleta.

Se realizó el secuenciado automático en la empresa Macrogen Inc. (Corea).

Para las reconstrucciones filogenéticas de las secuencias obtenidas se utilizó MEGA software (Tamura et al., 2011) comparando las secuencias obtenidas con secuencias del género *Heleobia* obtenidas de la base de datos GenBank. Se construyó un árbol de distancias (Kimura-2p) con criterio de agrupación por vecinos (Saitou & Nei, 1987). El apoyo de los agrupamientos en el árbol se evaluó con bootstrap de 1.000 réplicas (Kroll et al., 2012).

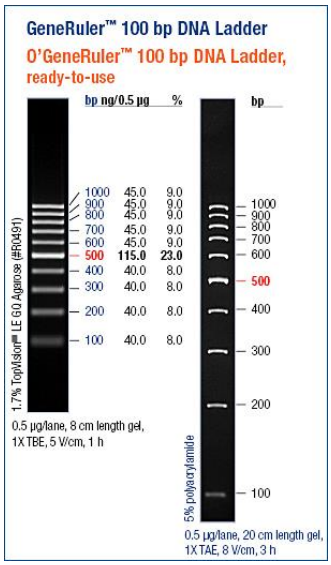


Figura 2. Marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific TM) empleado en las electroforesis en gel de agarosa 1%.

5.5. Ensayo cometa

Luego de verificar el nivel de viabilidad celular a través del ensayo de exclusión trypan blue (Thermo Fisher Scientific™). Se procedió a realizar el ensayo de electroforesis en células individuales (ensayo cometa) en su versión alcalina (Cotelle & Férard, 1999) adaptado para *H. cf australis* (Villar et al., 2015) (Figura 3) ya que las muestras superaron un 80% de viabilidad celular. Para poder determinar daño genético luego de la obtención de la suspensión de células a través del macerado en primer lugar se prepararon las láminas de observación microscópicas. Se obtuvieron geles uniformes y estables para que llegasen intactos al análisis microscópico. Las células fueron suspendidas en agarosa de bajo punto de fusión (LMP) y colocadas sobre el microgel. A continuación se lisaron las células para liberar el ADN lo cual permitió la degradación de las membranas celulares.

Se sometió al ADN a desnaturalización mediante la exposición a altas concentraciones de álcali (pH> 13) ya que de esta manera se logran expresar todos los tipos de daño genético (sitios álcali lábiles, cross-links, rupturas simple y doble hebra). Luego, se realizó la electroforesis en gel de agarosa sumergido en buffer a pH 13 con 0,8 V por cm. durante 30 min.

Se procedió a la neutralización de los álcalis mediante sucesivos lavados con buffer apropiado.

Luego de la neutralización se tiñó el ADN con fluorocromos, en éste caso ioduro de propidio para luego visualizar los cometas en microscopio epi-fluorescente Olympus con filtro de excitación de 505-560 nm con luz de mercurio de 100 W y filtro de barrido de 590 nm, con una magnificación de 240X.

Finalmente se obtuvieron las fotos de los cometas con el software Infinity Capture™ e Image Pro Plus™ y se analizaron con el software Comet Imager™ y con el CASP™ (Figura 4) que generan amplias bases de datos con más de 15 variables, de las cuales se utilizaron: Momento de la cola Olive (MCO) y % ADN de la cola, debido a su amplia utilización en la literatura científica así como su validación respecto a la óptima correlación con el daño genético.

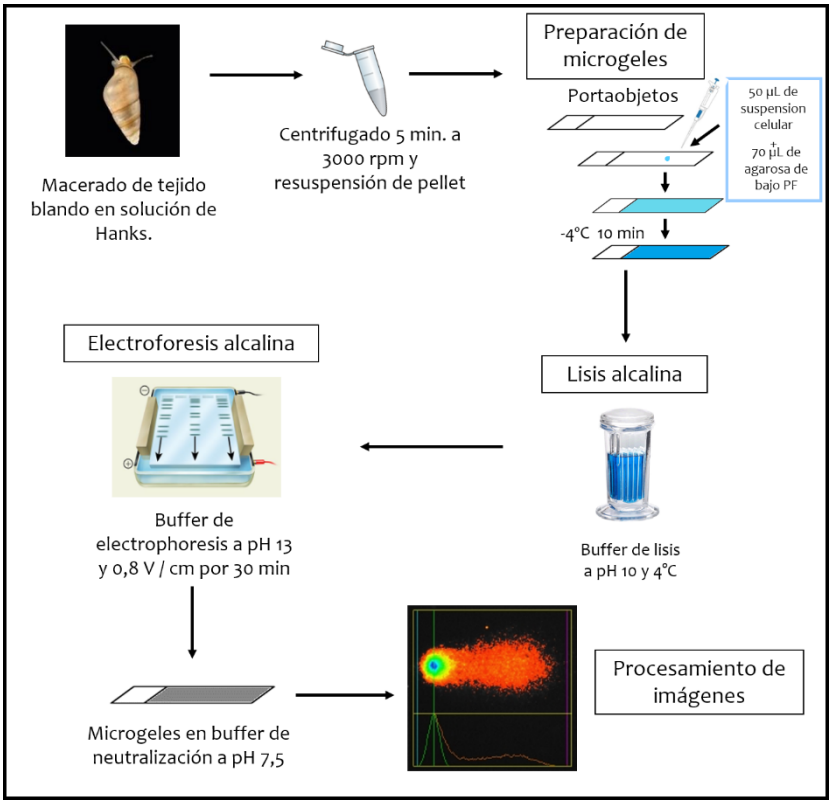


Figura 3. Protocolo del ensayo cometa en su versión alcalina adaptado para *Heleobia cf. australis.*

5.6. Análisis de los datos

Se consideraron los parámetros: % de ADN de la cola y momento de la cola Olive (MCO) debido a que son los índices estandarizados y de más amplio uso con este biomarcador de genotoxicidad lo que permite realizar comparaciones de los resultados obtenidos en otras investigaciones (Frieauff et al., 2001).

El porcentaje de ADN de la cola se define como la cantidad de ADN que ha migrado fuera del núcleo con respecto al contenido total de ADN celular, es directamente proporcional a la cantidad de ADN dañado y da una idea acerca de la proporción relativa de ADN en diferentes regiones de la cola (Kumaravel & Jha, 2006).

El momento de la cola Olive (MCO), obtenido según: *MCO = (Media de la cola – Media de la cabeza) x % de ADN de la cola / 100* y medido en unidades arbitrarias, es un parámetro desarrollado para describir la migración del ADN y es útil en cuanto a la información sobre la heterogeneidad de la respuesta dentro de una población celular ya que su cálculo considera las variaciones de la distribución del material genético dentro de la cola del cometa (Olive et. al., 1990).

Específicamente ha mostrado ser una medida de rupturas de una sóla hebra (SSBs del inglés: Single strand breaks) (Olive & Banath, 1993).

Además se cuantificaron las células que presentaron 100% de ADN en la cola como indicadoras de muerte celular o apoptosis. Se expresaron como frecuencia estadística; cantidad de células apoptóticas sobre el total de células analizadas para cada sitio.

Se aplicaron análisis estadísticos no paramétricos de Kruskal Wallis utilizando el software Statistica™ para estudiar los datos anteriormente mencionados con el fin de comparar el daño en el ADN entre las poblaciones de los diferentes sitios (Zar, 2010).

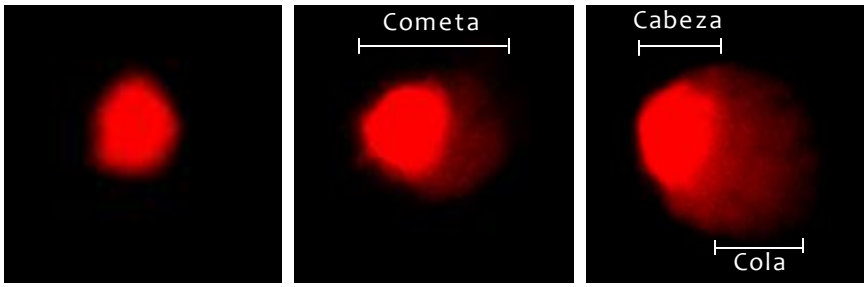


Figura 4. Imágenes del software CASP ™ obtenidas para células de *Heleobia cf. australis* del sitio G (Laguna Garzón). De izquierda a derecha se observa el daño creciente en el ADN.

6. RESULTADOS

6.1. Identificación molecular de la especie escogida

La amplificación por PCR para la enzima citocromo oxidasa I fue exitosa para 13 organismos, la visualización de algunos de éstos en la electroforesis en gel de agarosa se observan en la Figura 5.

Se obtuvieron 10 secuencias de 515 pares de bases de la citocromo oxidasa I, 7 de ellas pertenecientes al sitio de laguna Garzón y 3 correspondientes a la bahía de Montevideo.

El árbol filogenético (Figura 6) mostró que las secuencias colectadas en la bahía de Montevideo y laguna Garzón formaron un grupo monofilético con alto apoyo de bootstrap (99%). A su vez éste grupo incluyó a un individuo de Mar Chiquita (Argentina) identificado como *H. australis*. Por otro lado, un individuo de la Bahía de Montevideo no se agrupó con el resto de los individuos de *H. cf. australis* analizados, agrupándose con *H. cumingii*.

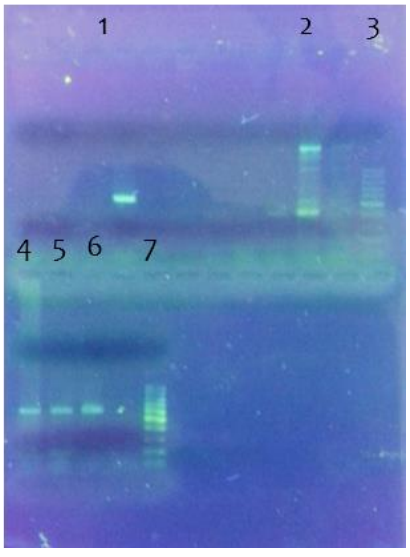


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Los productos de PCR observados corresponden a organismos de *Heleobia cf. australis* provenientes de distintos sitios de muestreo. Carriles 1 y 2: Bahía de Montevideo. Carriles 4, 5 y 6: Laguna Garzón. Carriles 3 y 7: Marcadores de peso molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific™).

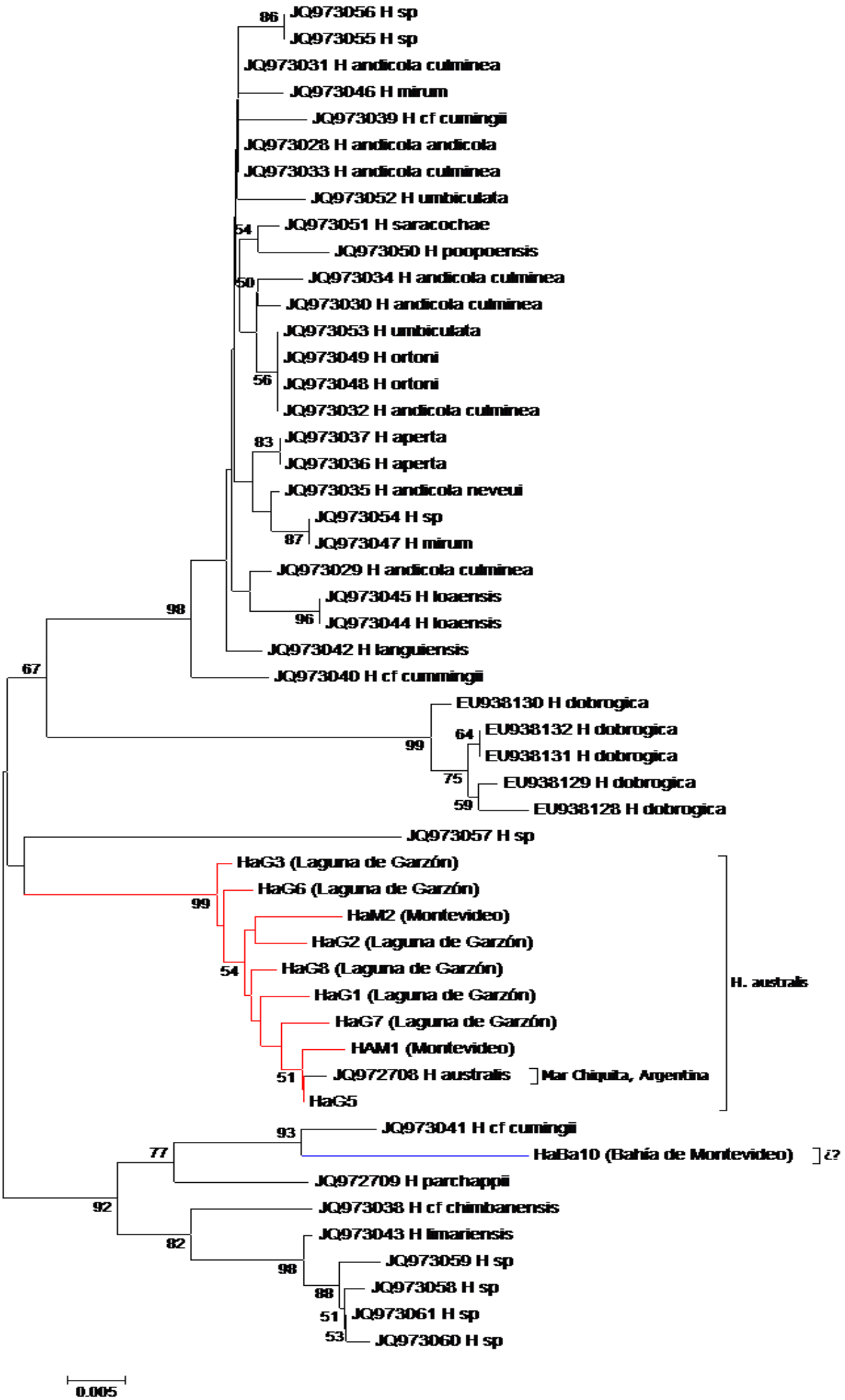


Figura 6. Árbol de distancias (Parámetro Kimura 2) con criterio de agrupación por vecinos de las secuencias obtenidas en éste estudio y las secuencias del género *Heleobia* obtenidas de GenBank.

6.2. Análisis de genotoxicidad

Las medias obtenidas de los parámetros de genotoxicidad analizados, así como sus respectivos valores de desviación típica, se muestran en la Tabla 3. Se observó que en la bahía externa se registran los mayores valores promedios de ADN dañado (% ADN de la cola, MCO), así como los menores para el sitio G de la zona costera hacia el Este. En el caso del MCO se observa también un valor elevado para la zona costera Este. Sin embargo cabe destacar que los valores máximos obtenidos de % de ADN en la cola fueron los registrados para la bahía interna (81,6%) (Tabla 4).

Tabla 3. Medias y desviaciones estándar de los parámetros genotóxicos analizados para cada sitio de estudio.

SITIO	% ADN cola	MCO
BI	16,82 ± 17,56	1,90 ± 2,38
BE	21,45 ± 18,07	2,20 ± 2,53
O	11,10 ± 12,64	1,73 ± 1,96
E	12,14 ± 10,94	2,22 ± 2,24
G	8,27 ± 11,13	1,17 ± 1,84

Tabla 4. Valores máximos de los parámetros genotóxicos obtenidos para cada sitio de estudio.

SITIO	% ADN cola	MCO
BI	81,06	13,34
BE	71,15	12,02
O	59,07	7,50
E	38,13	11,19
G	51,31	15,82

Se encontró una mayor frecuencia de células apoptóticas en la zona interna de la bahía respecto a la zona externa, zona costera hacia al Oeste, desembocadura del Arroyo Solís Grande y laguna Garzón. (Tabla 5).

Tabla 5. Frecuencia estadística de células apoptóticas de *H. cf. australis* encontradas en ensayo cometa.

Sitio	*f* células apoptóticas
BI	0,0345
BE	0,0116
O	0,0000
E	0,0025
G	0,0077

En cuanto a los análisis estadísticos de los datos de genotoxicidad obtenidos, se encontraron diferencias significativas para el porcentaje de ADN dañado entre los sitios analizados [χ^2 (4, *N* = 800) = 51,163 ; *p*= ,0000]. Éstas diferencias se observaron entre los sitios de la bahía (BI, BE) y el sitio G, así como entre la parte externa de la bahía (BE) y las zonas E y O. A su vez también se observaron diferencias entre la zonas Este, E y G [H (4, *N* = 800) = 68,703 ; *p*= ,0000] (Figura 7).

Los organismos de los sitios ubicados en el interior y exterior de la bahía presentaron mayor cantidad de ADN dañado mientras que los organismos de los sitios E y O presentaron un daño intermedio. Los ubicados en la zona G prácticamente no presentaron daño.

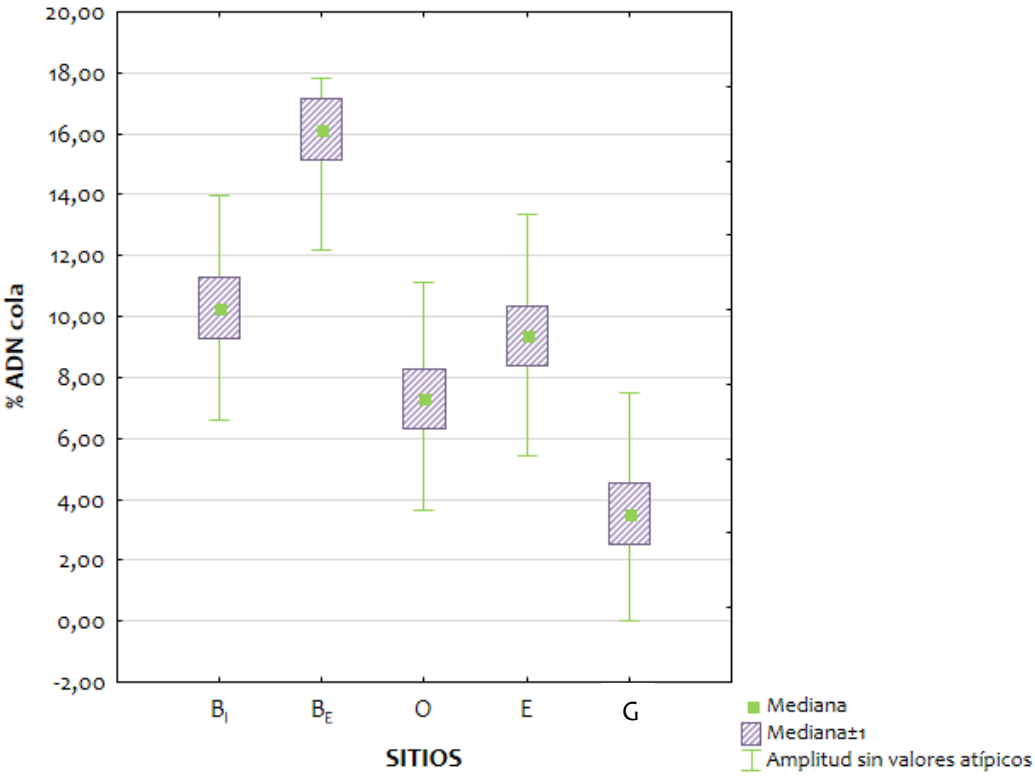


Figura 7. Gráfico de porcentaje de ADN en la cola del cometa para las poblaciones de *Heleobia cf. australis* correspondientes a los diferentes sitios.

En el estudio del momento de la cola del cometa (MCO) se observaron diferencias significativas entre los sitios [χ2 (4, *N* = 800) = 33,154 ; *p*= ,0000] (Figura 8). En este caso se observaron grandes diferencias en el origen del daño genético en los organismos presentes en los sitios de la bahía y zonas E, O respecto a los del sitio G [H (4, *N* = 800) = 50,605 ; *p*= ,0000]. Observándose mayores valores de MCO tanto en la bahía como en la zona E, respecto a los encontrados en G.

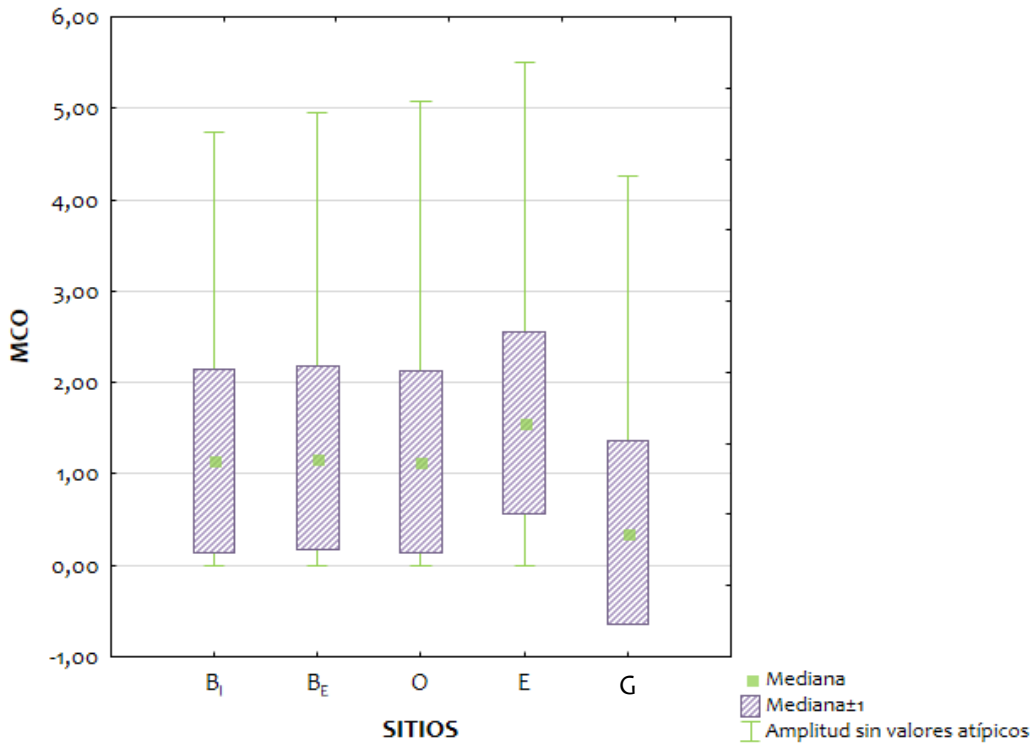


Figura 8. Gráfico de momento de la cola del cometa Olive (MCO) para las poblaciones de *Heleobia cf. australis* correspondientes a los diferentes sitios.

7. DISCUSIÓN

7.1. Identificación molecular de la especie centinela

Existe una gran controversia respecto a la homogeneidad de las especies de *Heleobia* en nuestra región (Cazzaniga, 2011). Los individuos pertenecientes a este género, particularmente *Heleobia australis* presentan cambios morfológicos según los sitios de colecta, que dificultan su identificación taxonómica. En este sentido investigaciones como la de De Francesco (2007) detallaron los problemas que surgen al utilizar fósiles de *Heleobia* en reconstrucciones paleoambientales. Estas diferencias morfológicas podrían ser explicadas por un lado, como producto de que los organismos presentan una gran plasticidad fenotípica, ajustando sus características vitales y morfológicas a las condiciones ambientales en las que se desarrollan sus poblaciones (Fiori & Carcedo, 2011). Mientras que por otro lado podrían explicarse como el producto de diferencias a nivel genético y por lo tanto tratarse de diferentes especies o subespecies. La identificación molecular realizada en el presente estudio clarifica en alguna medida la problemática en cuanto a la presencia de *Heleobia cf. australis* en las áreas analizadas, dado que no se encontraron diferencias en las secuencias de los organismos colectados. Esto coincide con lo descrito por d'Orbigny (1835) en sus estudios taxonómicos para este género en nuestra región. En las colectas realizadas en nuestro estudio se observó que los organismos pertenecientes a los sitios de mayor impacto (bahía) presentaban menor tamaño que los de los sitios de menor impacto como laguna Garzón. Esto podría sugerir que los organismos expuestos a un alto grado de contaminación realizan una mayor inversión energética en la reparación del daño y en menor medida, al crecimiento.

Por otro lado, uno de los organismos secuenciados no se agrupó dentro de la misma filogenia que el resto agrupándose con *Heleobia cumingii*. Esta especie se agrupa en otras ramas del árbol con diferentes especies lo que hace dudar acerca de su correcta clasificación taxonómica.

Además, el organismo identificado como *Heleobia australis* originario de Mar Chiquita (Argentina) se agrupó con los organismos secuenciados tanto de la bahía de Montevideo como de laguna Garzón, lo que sugeriría una homogeneidad específica desde Rocha hasta Argentina.

Estos resultados asientan una importante base para los análisis que se realizaron a continuación ya que asegura un correcto análisis de los efectos genotóxicos eliminando los artefactos que puedan surgir al utilizarse organismos de diferentes especies. Sin embargo, es importante destacar que los genes implicados en la reparación del ADN y por tanto en la expresión del daño genético están muy conservados, desde insectos como *Drosophila*, mamíferos hasta algunos invertebrados marinos, por ende las variaciones que pudieran existir a nivel específico no necesariamente afectarían los resultados globales en relación a la expresión del daño dentro de un mismo género (Seed, 1983; Mudry & Carballo, 2006).

De todas maneras la complementación con otros métodos de análisis filogenéticos serían convenientes para dilucidar completa y específicamente la situación de éste género en nuestra región y si resulta pertinente la comparación entre sitios respecto al daño genotóxico presentado. Por lo dicho anteriormente a continuación se mencionará a la especie centinela escogida como *Heleobia australis*.

7.2. Análisis de los efectos genotóxicos en *Heleobia australis* en relación a la presencia de contaminantes.

En estudios previos se logró revelar altos niveles de daño genético en organismos de la bahía de Montevideo, significativamente superiores a los obtenidos para poblaciones ubicadas en el entorno de la laguna Garzón (Kandratavicius et al., 2008a; b; Villar et al., 2015). En el presente estudio se tomaron en cuenta otros sitios de la costa uruguaya en los que se aplicó el ensayo cometa en *Heleobia australis*, incorporando sitios con moderado-alto impacto (parte externa de la bahía: BE) además de sitios con alto impacto (interior de la bahía: BI) y sitios con moderado-bajo impacto (zonas costeras hacia el Este y Oeste: E, G y O).

Los valores obtenidos para el % de ADN en la cola del cometa en la bahía (medias: BI 16,82% y BE 21,45%) fueron mayores que los obtenidos por Villar et al., 2015 (16,6%) para la zona más impactada de la bahía de Montevideo, disminuyendo a medida de los sitios se alejan de la misma, lo que muestra un mayor nivel de deterioro de los organismos como consecuencia del empeoramiento de la zona.

En estudios similares realizados en mejillones en el estuario del río Cecina (Toscana, Italia) por Nigro et. al (2006), cuyo nivel de urbanización y contaminación industrial es considerablemente mayor que el del presente estudio y con presencia de metales pesados como Cr, Pb y Hg, se obtuvo un nivel de daño genético medido por porcentaje de ADN (35,9%) elevado respecto a los obtenidos en el presente trabajo (16,82%) para el sitio más contaminado.

El nivel de daño genético significativamente mayor constatado en la zonas de la bahía de Montevideo con respecto a los demás sitios, se corresponde con numerosos estudios previos realizados en la misma zona de estudio (Gómez-Erache et al., 2001; Danulat et al., 2002; Muniz et al., 2002; 2004a, b; 2005; 2011b; García-Rodríguez et al., 2010; Venturini et al., 2012; 2015), en los que se constató un gradiente de calidad ambiental, con las peores

condiciones dentro de las estaciones internas de la bahía de Montevideo y una mejora hacia la zona costera adyacente. Sin embargo, las medias obtenidas de los parámetros de genotoxicidad analizados para el sitio interno de la bahía fueron menores que los de la parte externa, lo cual se corresponde con los estudios realizados por Venturini et al. (2015) dónde se encontró que también las partes externas de la bahía presentan niveles contaminación crónica debida a hidrocarburos derivados tanto del petróleo como de la refinación del mismo.
En este sentido, si bien los valores para el nivel de daño genético obtenidos en el presente estudio para la zona interna de la bahía no fueron los más elevados, no existieron diferencias significativas entre las zonas interna y la zona externa de la bahía, por lo que podría considerarse que la bahía en su totalidad posee un alto grado deterioro ambiental dadas las presiones antrópicas a las que está sometida.

Está claro que la bahía de Montevideo presenta una mezcla compleja de contaminantes por lo que no podemos hablar de relaciones de causa efecto entre los contaminantes y el nivel de daño, pero si podemos postular algunas relaciones. En este sentido, el nivel de daño (alto porcentaje de ADN dañado) constatado en el presente estudio en los sitios de la bahía se puede relacionar con la presencia de contaminantes orgánicos como hidrocarburos alifáticos (HAs) y n-alcanos, e hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) reportados en la zona por varios autores (Muniz et al. 2011a; Venturini et al., 2004; 2015). Los hidrocarburos pueden ser metabolizados en intermedios reactivos que forman aductos de ADN o producir roturas de hebra directamente (Nacci et al., 1996). Las rupturas de la hebra de ADN se han medido ampliamente por diferentes métodos y han sido aceptadas como biomarcadores de genotoxicidad en peces marinos y bivalvos (Depledge, 1998), especialmente para la exposición a hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs). Los niveles de daño en el ADN, medidos como roturas de una sola cadena por el ensayo de cometa, en peces *Ameriurus nebulosus* se elevaron en sitios contaminados con HPAs (Padrangi et al., 1995).
Si bien para los HPAs totales los valores de referencia para los niveles de efectos adversos base y probable son TEL = 1684,06 ng g^{-1} y PEL = 16770,4 ng g^{-1} respectivamente (MacDonald et al., 1996), Muniz et al. (2011a) encontró en sedimentos de la bahía concentraciones de HPAs superiores a 500 ng g^{-1} revelan niveles relativamente altos de contaminación (Notar et al., 2001). De igual manera la contribución al daño en el ADN constatado puede relacionarse con la presencia de HAs dado que las concentraciones para los mismos obtenidas por Muniz et al. (2011a) en la bahía de Montevideo superaron los niveles umbrales establecidos para sedimentos no contaminados. Por otro lado los valores encontrados por Muniz et al. (2011a) para n-alcanos en las zonas interna y externa de la bahía así como en la zona costera hacia el Oeste de la misma no superan el límite establecido por la UNEP (1992) para ser considerados como nocivos, por lo que estos no explicarían la contribución al daño genético, dado que si bien los n-alcanos son constituyentes crónicos de ambientes acuáticos y sus concentraciones han aumentado considerablemente debido a actividades antropogénicas, lo cual causa efectos indeseables especialmente en áreas costeras adyacentes a zonas urbanas altamente pobladas, estos pueden indicar tanto fuentes antropogénicas como naturales de hidrocarburos.

Otro factor que podría estar contribuyendo con el efecto genotóxico observado es la presencia de metales pesados como Cromo y Plomo reportados en varios estudios de la zona de la bahía (Muniz et al., 2004b; 2011a) donde las concentraciones más elevadas encontradas fueron para el Cromo en la parte interna de la bahía.

El Cromo se caracteriza por su persistencia ambiental y capacidad de inducir efectos mutagénicos en sistemas biológicos por crosslinks ADN-proteína (Rocha et al., 2015), uno de los tantos tipos de daño genético detectado por el ensayo cometa. De esta manera los valores elevados de daño genético de la bahía estarían relacionados a altas concentraciones de Cromo producto de las descargas industriales de metalúrgicas, curtiembres y pinturerías ya que la principal fuente de liberación de Cromo en los ecosistemas acuáticos está relacionada con la aplicación industrial de este metal.

Por otra parte el Plomo está descripto como un metal muy tóxico, ampliamente utilizado en varios procesos industriales, tales como ropa de tinte, barniz, pesticidas, explosivos, baterías y fabricación de pinturas (Johnson, 1998). Los mecanismos de genotoxicidad de dicho metal pueden implicar daño indirecto al ADN que afecta a la estabilización de la cromatina o a través de la interacción del metal con los sistemas de reparación (Ergene et al., 2007). Por lo tanto los valores de Plomo constatados en la zona (Muniz et al., 2004b) podrían explicar la contribución al daño genético revelado por el ensayo cometa, aunque en menor medida dada su menor concentración respecto al Cromo.

Otro aspecto destacable es el hecho de que si bien los organismos de la bahía interna no presentaron los mayores valores de daño genético lo cual era esperable por ser una zona con una gran carga de contaminantes, presentaron una elevada frecuencia de apoptosis y se observó un menor tamaño corporal en los organismos. Bigliomini et al. (2017) encontró alteraciones en el peso específico, biometría, forma y composición elemental en la concha de un gasterópodo (*Lottia subrugosa*) recogida a través de un gradiente de contaminación en el estuario altamente impactado de Santos (San Pablo, Brasil), las cuales se relacionaron con respuestas de biomarcadores (daño al ADN y oxidación lipídica) y presencia de contaminantes orgánicos (HPAs, entre otros) y metales pesados (Cr, Pb, entre otros). En este sentido los niveles de agentes mutagénicos en esta zona estarían dañando el genoma de los organismos a una tasa que supera la capacidad de reparación de ADN, saturándolas al punto de llevar a las células a activar la vía apoptótica. De este modo, la viabilidad de los individuos se ve comprometida a corto plazo, generando una predominancia de organismos juveniles con tiempos relativamente menores de exposición, lo que genera una disminución global del daño genético registrado por los parámetros del ensayo cometa, pero que se reflejan en un aumento de los valores de células apoptóticas (Mudry & Carballo, 2006). Así como una mayor cantidad de organismos de tamaño menor en los sitios de mayor impacto.

Finalmente, dado que el parámetro MCO generalmente indica la presencia de contaminantes que generan rupturas de ADN simple hebra, tales como los hidrocarburos, los resultados obtenidos para éste mostraron diferencias significativas entre los sitios de la bahía y zonas costeras O y E, respecto al sitio G siendo mayor el nivel de daño genético en las zonas de la bahía que el constatado en la zona de la laguna Garzón. Lo cual concuerda en cierta medida con la bibliografía citada previamente donde las concentraciones más elevadas para este tipo de contaminantes se encontraron en la bahía de Montevideo (Muniz et al., 2011a; Venturini et al., 2004; 2015). Y si bien

no existen estudios en cuanto a la concentración de hidrocarburos en la laguna Garzón, las actividades antrópicas en dicha zona (Defeo et al., 2009) no estarían implicando la presencia de los mismos.
La comparación de resultados entre estudios resulta difícil para este parámetro ya que diferentes sistemas de análisis de imágenes devuelven valores diferentes para MCO, debido a que los algoritmos utilizados para definir el centro de gravedad de la distribución de ADN varían ampliamente entre paquetes de software diferentes (Kumaravel & Jha, 2006).

El nivel de daño en los sitios de las zonas costeras (O, E y G) fue significativamente menores a los de la bahía, lo cual estaría de acuerdo con el gradiente de contaminación reportado para dichas zonas, con una mayor contaminación en la bahía y un progresivo descenso a medida que nos alejamos de ésta (Danulat et al., 2002; Muniz et al., 2002; 2004a, b; 2005; 2011a; b; Venturini et al., 2004; Venturini et al., 2015).
Sin embargo, el nivel de daño genético revelado en estas zonas, principalmente en el sitio O y sitio E, es relativamente alto a pesar de presentar un impacto antrópico menor con respecto a la bahía.
Muniz et al. (2011b) informó en la zona costera al Oeste de la bahía (Punta Yeguas), en el que se encuentra el sitio O, un nivel eutrófico dado por altas concentraciones de nutrientes como Nitrógeno, entre otros. Así como un deterioro en las condiciones bentónicas por un posible aumento en la descarga de efluentes no tratados en ésta zona. Esto podría explicar a grandes rasgos el daño genético observado dado que la composición de los efluentes no tratados puede abarcar todo tipo de contaminantes, entre ellos aquellos que se comporten como agentes genotóxicos (Widziewicz et al., 2012).
Los menores valores para el daño genético constatado por ambos parámetros de genotoxicidad analizados corresponden a los del sitio G (Laguna Garzón), lo que era esperable ya que la laguna Garzón es considerada de escaso impacto. Sin embargo, si bien no cuenta con actividades industriales cercanas, el daño revelado en el presente estudio para éste sitio fue mayor (8,27%) que el registrado en estudios previos de Villar et al. (2015) (5,6%), revelando un incipiente deterioro de la zona. Esto concuerda con el estudio de Pita et al. (2017) en el que se clasificó a la laguna Garzón (sitio G) como un ambiente eutrofizado.
En el caso de los sitios pertenecientes a la zona costera hacia el Este, tanto del arroyo Solís Grande como de la laguna Garzón, no existe información acerca de los niveles de hidrocarburos y metales pesados. De todas maneras los niveles de daño observados con el ensayo cometa revelan la presencia de posibles contaminantes que estén afectando el genoma de *Heleobia australis*. Dado el nivel de eutrofización constatado en estas zonas y si bien los estudios previos realizados para concluirlo (Spósito, 2015; Pita et al.,2017) se han basado en análisis a nivel de composición bioquímica de los sedimentos, éstos podrían indicar un incipiente deterioro ambiental generalizado que suponga también la posible presencia de contaminantes que generen daños a nivel genético. Además, Rodríguez-Gallego (2008) encontró altas concentraciones de Nitrógeno en sedimentos de la laguna Garzón, lo cual podría deberse en parte a la presencia de contaminantes mutagénicos que lo contengan como plaguicidas o fertilizantes (De Lorenzo et al., 2001; Khasanov et al., 2006). Por otro lado, el incremento desmedido de nutrientes como Nitrógeno y Fósforo afecta a las comunidades biológicas favoreciendo la aparición de floraciones algales que generan contaminación por cianotoxinas (Cárdenas & Sánchez, 2013), algunas de las cuales pueden inducir daño en el ADN (Ferrão-Filho et al., 2011).

8. CONCLUSIONES

La especie escogida como centinela muestra homogeneidad genética suficiente como para ser utilizada en análisis ambientales con biomarcadores de genotoxicidad, confirmando en principio una misma unidad evolutiva a lo largo de la costa de Montevideo y Rocha.

Se logró evaluar diferentes sitios de muestreo en contraste a los estudios previamente realizados (Villar et al., 2015) encontrándose diferencias significativas en el nivel de daño genético entre los sitios analizados, estableciendo relaciones entre niveles de contaminación y daño genético revelados por el ensayo cometa, en particular respecto al % de ADN de la cola del cometa. Por otra parte, los niveles de daño genético total hallados en la bahía y en las zonas costeras hacia el Oeste y Este de la misma, representan una señal de alerta respecto al deterioro creciente de esos sitios.

Este trabajo confirma que *H. australis* podría ser utilizado como centinela para el monitoreo de zonas estuarinas, dada su amplia distribución geográfica en toda la costa uruguaya así como su alta disponibilidad y abundancia, a lo largo de todo el año y su capacidad de tolerancia frente a la inestabilidad ambiental característica de las zonas estuarinas. Sería un centinela útil tanto en etapas tempranas de impacto ambiental así como en casos de contaminación crónica.
Su fácil mantenimiento y adaptación lo convierte en un buen modelo para pruebas de laboratorio y no sólo para monitoreo ambiental *in situ*. Además, para el biomarcador seleccionado presentó una respuesta estrechamente vinculada al impacto revelado por presencia y niveles de contaminantes del área de estudio.

9. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

En cuanto a la problemática taxonómica existente respecto a la especie utilizada, es importante señalar que para seguir contribuyendo a la resolución de la misma sería necesario una mayor cantidad de organismos y marcadores de variabilidad genética y morfológica. De todas formas, dado que los sistemas de reparación genética están evolutivamente conservados, esto no representa un impedimento para continuar profundizando el monitoreo a través de *Heleobia*.

La evaluación ambiental del medio acuático es de suma importancia, dados los servicios ecosistémicos que brindan los estuarios y la relevancia que tienen las comunidades de organismos que los habitan. Si bien la aplicación del ensayo cometa en los organismos de *Heleobia australis* demostró ser sensible a los daños genéticos revelados respecto al estado ambiental de la bahía de Montevideo, y otras zonas costeras, sería importante complementar este estudio con el uso de otros biomarcadores de daño genético como el test de micronúcleos y de estrés oxidativo, con el objetivo de esclarecer qué contaminantes ejercen mayor impacto en cada zona. En este mismo sentido, se sugiere continuar ampliando los sitios de muestreo así como analizar el comportamiento de los biomarcadores propuestos estacionalmente.

Este trabajo es un aporte que pretendió profundizar estudios previos vinculados al uso de moluscos como bioindicadores (Villar et al., 2015), destacando sin embargo, que son necesarios más estudios que abarquen el análisis de otros contaminantes así como estudios *in vitro* que relacionen los agentes genotóxicos predominantes en la bahía y otras zonas costeras con respuestas específicas expresadas por parámetros específicos del ensayo cometa utilizado como biomarcador.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre, A. A. & Tabor, G. M. (2004). Special Section: Marine Sentinel Species. Introduction: Marine Vertebrates as Sentinels of Marine Ecosystem Health. *Eco Health, 1*(3), 236–238.

Ayup, R. (1981). Contribución al conocimiento del material en suspensión de la bahía de Montevideo. *Informe Técnico de SOHMA,* 81-01.

Azqueta, A. & Collins, A. R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology, 87*(6), 949-968.

Barnes, R. S. K., Calow, P. & Olive, J. W. (1995). *Os invertebrados: uma nova síntese*. San Pablo, Brasil: Atheneu.

Bayne, B. L., Brown, D. A., Burns, K., Dixon, D. R., Ivanovici, A., Livingstone, D. A., Lowe, M. N., Moore, D. M., Stebbing, A. R. D. & Widdings, J. (1985). *The effects of stress and pollution on marine animals*. New York, U.S.A: Praeger.

Begliomini, F. N., Maciel, D. C., De Almeida, S. M., Abessa, D. M., Maranho, L. A., Pereira, C. S. Yogui, G. T., Zanardi-Lamardo, E. & Castro, I. B. (2017). Shell alterations in limpets as putative biomarkers for multi-impacted coastal areas. *Environmental Pollution*, 1-10.

Bischoff, K., Priest, H. & Mount-Long, A. (2010). Animals as Sentinels for Human Lead Exposure: A Case Report. *Journal of Medical Toxicolgy*, *6*(2), 185–189.

Bucheli, T. D. & Fent, K. (1995). Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 25*(3), 201–268.

Burone, L., Muniz, P., Pires-Vanin, A. M. S. & Rodríguez, M. (2003). Spatial distribution of organic matter in the surface sediments of Ubatuba Bay (Southeastern – Brazil). *Anais da Academia Brasileira de Ciencias, 75*(1), 77-90.

Capriglione, T., Delorio, S., Gay, F., Capaldo, A., Vaccaro, M. C., Morescalchi, M .A. & Laforgia, V. (2011). Genotoxic effects of the fungicide ethiophanate-methylon Podarcis sicula assessed by micronucleus test,comet assay and chromosome analysis. *Ecotoxicology*, *20*, 885–891.

Cazzaniga, N. J. (Ed.). (2011). El género *Heleobia* (Caenogastropoda: Cochliopidae) en América del Sur. *Amici Molluscarum, Número especial,* 11-48.

Chakraborty, R., Mukherjee, A. K. & Mukherjee, A. (2009). Evaluation of genotoxicity of coal fly ash in Allium cepa root cells by combining comet assay with the Allium test. *Environmental Monitoring and Assessment*, *153*, 351–357.

Clement, B., Devaux, A., Perrodin, Y., Danjean, M. & Ghidini-Fatus, M. (2004). Assessment of Sediment Ecotoxicity and Genotoxicity in Freshwater Laboratory Microcosms. *Ecotoxicology, 12*, 323–333.

Collins, A. R., Dobson, V. L, Dusinska, M., Kennedy, G. & Stetina, R. (1997). The comet assay: what can it really tell us?. *Mutagenesis Research,* 29, 183-19

Costanza, R., d´Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O´Neill, R. V., Paruelo, J., Raskin, R. G., Sutton, P. & Van den Belt, P. M. (1997). The value of the world´s ecosystem services and natural capital. *Nature*, *387*, 253-260.

Cotelle, S. & Férard, J. F. (1999). Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. *Environmental and Molecular Mutagenesis, 34*(4), 246-255.

d'Orbigny, A. D. (1835). Synopsis terrestrium et fluviatilium molluscorum in suo per Americam Meridionalem itinere collectorum. *Magasin de zoologie, d'anatomie comparée et de palaeontologie 5, (61–62),* 1–44.

Danulat, E., Muniz, P., García-Alonso, J. & Yannicelli, B. (2002). First assessment of the highly contaminated harbour of Montevideo, Uruguay. *Marine Pollution Bulletin*, *44*, 554-565.

Dauer, D. M. (1993). Biological criteria, environmental health and estuarine macrobenthic community structure. *Marine Pollution Bulletin*, 26(5), 249-257.

Day, J. W., Hall, C. A. S., Kemp, W. M. & Yánez-Arancibia, A. (1989). *Estuarine Ecology*. New York, U.S.A.: John Wiley Interscience Publications.

De Francesco, C. G. (2007). Las limitaciones a la identificación de especies de *Heleobia Stimpson*, 1856 (Gastropoda, Rissooidea) en el registro fósil del Cuaternario Tardío y sus implicancias paleoambientales. *Ameghiniana*, *44*(3), 631–635.

De Lorenzo, M. E., Scott, G.I. & Ross, P. E. (2001). Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry, 20 (1),* 84–98.

Defeo, O., Horta, S., Carranza, A., Lercari, D., de Álava, A., Gómez, J., Martínez, G., Lozoya, J.P., Celentano, E. (2009). *Hacia un Manejo Ecosistémico de Pesquerías. Áreas Marinas Potegidas en Uruguay*. Facultad de Ciencias-DINARA, Montevideo.

den Besten, P. J. & Munawar, M. Ed. (2005). *Ecotoxicological testing of marine and freshwater ecosystems: emerging techniques, trends, and strategies*. Boca Raton, Florida: CRC PressTaylor & Francis Group.

Depledge, M. H. (1998). The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. *Mutation Research*, 399, 109–122.

Dunn, B.P. (1991). Carcinogen adducts as an indicator for the public health risks of consuming carcinogen-exposed fish and shellfish. *Environ. Health Perspect, 90,* 111–116.

Emmanouil, C., Sheehan, T. M. T. & Chipmana, J. K. (2007). Macromolecule oxidation and DNA repair in mussel (*Mytilus edulis L.*) gill following exposure to Cd and Cr(VI). *Aquatic Toxicology, 82*, 27–35.

Ergene , S., Çavaş, T., Çelik, A., Köleli, N., Kaya, F. & Karahan, A. (2007). Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology, 16*, 385–391.

Fernández-Tajes, J., Flórez, F., Pereira, S., Rábade, T., Laffon, B. & Méndez, J. (2011). Use of three bivalve species for biomonitoring a polluted estuarine environment. *Environmental Monitoring and Assessment, 177,* 289–300.

Ferrão-Filho, A. & Kozlowsky-Suzuki, B. Cyanotoxins: Bioaccumulation and Effects on Aquatic Animals. *Marine Drugs, 9,* 2729-2772.

Fiori, S. M. & Carcedo, M. C. (2011). Estado actual del conocimiento sobre *Heleobia australis* y perspectivas futuras. En: El género *Heleobia* (Caenogastropoda: Cochliopidae) en América del Sur. *Amici Molluscarum, Número especial,* 11-48.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3(5)*, 294-299.

François, A. & Risso, R. D. (1982). Efectos de la estratificación del Río de la Plata sobre los parámetros normales. En: *Plan para la Evaluación de la Contaminación en el Río de la Plata*, SOHMA, Actividades 1981, Tomo 1.

Frieauff, W., Hartmann, A. & Suter, W. (2001). Automatic analysis of slides processed in the comet assay. *Mutagenesis, 16*(2), 133-137.

García-Rodríguez, F., Hutton, M., Brugnoli, E., Venturini, N., Del Puerto, L., Inda, H., Bracco, R., Burone, L. & Muniz, P. (2010). Assessing the effect of natural variability and human impacts on the environmental quality of a coastal metropolitan area (Montevideo Bay, Uruguay). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences,* 5(1), 91-100.

Giménez, L., Borthagaray, A. I., Rodríguez, M., Brazeiro, A. & Dimitriadis, C. (2005). Scale-dependent patterns of macrofaunal distribution in soft-sediment intertidal habitats along a large-scale estuarine gradient. *Helgoland Marine Research,* 59, 224-236.

Gómez-Erache, M., Vizziano, D., Muniz, P., & Nagy, G. J. (2001). The Health of the Río de la Plata system: Northerm Coast, Uruguay. In: T. Chopin, P.G. Wells (Eds.), *Opportunity and Challenges for Protecting, Restoring and Enhaancing Coastal*

habitats in the Bay of Fundy. Proccedings of the 4th Bay of Fundy Science Worshops, Saint John, New Brunswick. Environment Canada, Atlantic Region. Occasional Report N° 17, Environment Canada, Darmouth, Nova Scotia.

Gray, J. S., Clarke, K. R., Warwick, R. M. & Hobbs, G. (1990). Detection of initial effects of pollution on marine benthos: an example from the Ekofisk and Eldfisk oilfields, North Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 66, 285–299.

Grazeffe, V.S., Tallarico, L., Pinheiroa, A., Kawanoa T., Suzukib M.F., Okazakib K., Braganca C. A., Nakano E. (2008). Establishment of the comet assay in the freshwater snail Biomphalaria glabrata (Say, 1818). *Mutation Research, 654*, 58–63.

Guerrero, R. A., Acha, E. M., Framiñan, M. B. & Lasta, C. A. (1997). Physical oceanography of the Rio de la Plata estuary, Argentina. *Continental Shelf Research, 17*, 727-742.

Gupta, R. C., Reddy, M. V. & Randerath, K. (1982). 32P-postlabelling analysis of nonradioactive aromatic carcinogen DNA adducts. *Carcinogenesis, 3*, 1081–1092.

Hamoutene, D., Payne, J.F., Rahimtula, A. & Lee, K. (2002). Use of the comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. *Marine Environmental Research, 54*, 471–474.

Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V. & Tice, R. R. (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis, 18*(1), 45–51.

Henshel, D. S., Harrass, M. C. & Black, M. C. (Eds.). (1999). Environmental Toxicology and Risk Assessment: Standardization of Biomarkers for Endocrine Disruption and Environmental Assessment: 8th Volume. West Conshohocken, PA: ASTM.

Hyland, J., Balthis, L., Karakassis, I., Magni, P., Petrov, A., Shine, J., Vestergaard, O. & Warwick, R. (2005). Organic carbon content of sediments as an indicator of stress in the marine Benthos. *Marine Ecology Progress Series, 295*, 91-103.

I.M.M. (2009). Informe Ambiental de Montevideo. Uruguay.

I.M.M. (2016). Programa de monitoreo de agua de playas y costa del departamento de Montevideo. Informe Anual. Uruguay.

Johnson, F. M. (1998). The genetic effects of environmental lead. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 410*, 123–140.

Kandratavicius, N., Villar, S. & Muniz, P. (2008)a. Evaluación de la respuesta biológica al estrés ambiental: aplicación del ensayo cometa en *Heleobia australis* (D'orbigny, 1835) (Mollusca: Gastropoda). II Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC), Mar del Plata, Argentina.

Kandratavicius, N., Villar, S. & Muniz, P. (2008)b. *Heleobia australis* (D'orbigny, 1835): centinela para monitoreo de calidad ambiental. IX Jornadas de Zoología del Uruguay, Montevideo Uruguay.

Khasanov, U., Rasulev, U. Kh., Usmanov, D. T. & Iskhakova, S. S. (2006). Detection and analysis of nitrogen-containing pesticides in environment by surface-ionization methods. *Surface and Interface Analysis, 38*, 309–312.

Knox, G. (1986). *Estuarine Ecosystems: a systems approach*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.

Kumar, R., Nagpure, N. S., Kushwaha, B., Srivastava, S. K. & Lakra, W. S. (2010). Investigation of the Genotoxicity of Malathion to Freshwater Teleost Fish Channa punctatus (Bloch) using the Micronucleus Test and Comet Assay. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 58*, 123–130.

Kumaravel, T. S. & Jha, A. N. (2006). Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutation Research, 605*(1–2), 7–16.

Large, A.T., Shaw, J.P., Peters, L.D., McIntosh, A.D., Webster, L., Mally, A. & Chipman, J.K. (2002). Different levels of mussel (*Mytilus edulis*) DNA strand breaks following chronic field and acute laboratory exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research, 54*, 493–497.

Livingstone, D. R., Donkin, P. & Walker, C. H. (1992). Pollutants in marine ecosystems: an overview. In: Walker C.H., Livingstone D.R. (Eds.), *Persistent Pollutants in Marine Ecosystems*. Oxford: Pergamon Press.

MacDonald, D. D, Carr, R. S., Calder, F. D. & Long, E. R. (1996). Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. *Ecotoxicology, 5*, 253–278.

Machella, N., Battino, M., Pisanelli, B. & Regoli, F. (2006). Influence of the SCGE Protocol on the Amount of Basal DNA Damage Detected in the Mediterranean Mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental and Molecular Mutagenesis, 47,* 579-586.

Magni, P., Micheletti, S., Casu, D., Floris, A., Giordani, G., Petrov, A. N., De Falco, G. & Castelli, A. (2005). Relationships between chemical characteristics of sediments and macrofaunal communities in the Cabras lagoon (Western Mediterranean, Italy). *Hydrobiologia, 550*, 105–119.

McCarthy, J.F., (1990). Implementation of a biomarker-based environmental monitoring program. En: McCarthy, J.F. & Shugart, L.R. (Eds.). *Biomarkers of environmental contamination* (pp. 429–440). Boca Raton, FL: CRC/Lewis Publishers.

Miller, E. C. & Miller, J.A. (1981). Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer Res., 47*, 1055–1064.

Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research, 16*(3), 1215.

Mitchelmore, C.L. & Chipman, J. K. (1998). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res., 399*, 135–147.

Morgado, M. E. & Bebianno, M. J. (2005). A mussel watch in the Ria Formosa lagoon. Programa de vigilancia de mejillones en la Ria Formosa. *Ciencias Marinas, 31,* 231-241.

Moyano, M., Moresco, H., Blanco, J., Rosadilla, M. & Caballero, A., (1993). Baseline studies of coastal pollution by heavy metals, oil and PAHs in Montevideo. *Marine Pollution Bullletin, 26*, 461-464.

Mudry, M. D. & Carballo, M. A. (2006). *Genética Toxicológica*. Bs. As., Argentina: Ed. de los Cuatro Vientos.

Muniz, P. & Venturini, N. (2015). Macrobenthic communities in a temperate urban estuary of high dominance and low diversity: Montevideo bay (Uruguay). *CICIMAR Oceánides, 30*(1), 9-20.

Muniz, P., Venturini, N. & Martínez, A. (2002). Physico-chemical and pollutans of the benthic environment of the Montevideo Coastal Zone, Uruguay. *Marine Pollution Bulletin, 44,* 962-968.

Muniz, P., Venturini, N. & Gómez-Erache, M. (2004)a. Spatial distribution of chromium and lead in sediments from coastal areas of the Río de la Plata estuary (Montevideo, Uruguay). *Brazilian Journal of Biology, 64*, 103-116.

Muniz, P., Danulat, E., Yannicelli, B., García-Alonso, J., Medina, G. & Bícego, M. (2004)b. Assessment of contamination by heavy metals and petroleum hydrocarbons in sediments of Montevideo Harbour (Uruguay). *Environment International, 29*, 1019-1028.

Muniz, P., Venturini, N., Pires-Vanin, A. M. S., Tommasi, L. R. & Borja, A. (2005). Testing the applicability of a Marine Biotic Index (AMBI) to assessing the ecological quality of soft-bottom benthic communities, in the South America Atlantic region. *Marine Pollution Bulletin, 50*, 624-637.

Muniz, P., Brugnoli, E., García-Rodríguez, F., Venturini, N., Burone, L., Hutton, M., Rodríguez, M., Pita, A., Kandratavicius, N., & Perez, L. (2011)a. Monitoreo de biota y sedimento de la zona costera de Montevideo. *Informe final de Primera Etapa*. Oceanografía y Ecología Marina, Facultad de Ciencias, UdelaR. Intendencia Municipal de Montevideo.

Muniz, P., Venturini, N., Hutton, M., Kandratavicius, N., Pita, A., Brugnoli, E., Burone, L. & García-Rodríguez, F. (2011)b. Ecosystem health of Montevideo coastal zone: A multi approach using some different benthic indicators to improve a ten-year-ago assessment. *Journal of Sea Research, 65*, 38-50.

Muniz, P., Hutton, M., Kandratavicius, N., Lanfranconi, A., Brugnoli, E., Venturini, N., & Giménez, L. (2012). Performance of biotic indices in naturally stressed estuarine environments on the Southwestern Atlantic coast (Uruguay): a multiple scale approach. *Ecological Indicators, 19*, 89-97.

Nacci, D. E., Cayulab, S., & Jackim, E. (1996). Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology, 35*, 197-210.

Nagy, G. J., Lopez Laborde, J. & Anastasía, L. (1987). Caracterización de ambientes en el Río de la Plata Exterior (salinidad y turbiedad óptica). *Investigaciones Oceanológicas, 1,* 31-56.

Nigro, M., Falleni, A., Del Barga, I., Scarcelli, V., Lucchesi, P., Regoli, F. & Frenzilli, G. (2006). Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology*, *77*, 339–347.

Notar, M., Leskovšek, H. & Faganeli, J. (2001). Composition, distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin, 42*,36–44.

O'Connor, W. P. (1991). A numerical model of tides and storm surges in the Río de la Plata estuary. *Continental Shelf Research, 11*(12), 491-508.

Olive, P. L. & Banath, J. P. (1993). Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutation Research, 294*(3), 275–83

Olive, P. L. & Durand R. E. (2005). Heterogeneity in DNA Damage Using the Comet Assay. *Cytometry Part A, 66A*, 1–8.

Olive, P. L., Banáth, J. P. & Durand R. E. (1990). Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the "Comet" Assay. *Radiation Research*,122, 86-94.

Pandrangi, R., Petras, M., Ralph, S. & Vrsoc, M. (1995). Alkaline single cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environmental and Molecular Mutagenesis, 26*, 345–56.

Parolini, M., Binelli, A. & Provini, A. (2011). Assessment of the Potential Cyto–Genotoxicity of the Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug (NSAID) Diclofenac on the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*). *Water, Air and Soil Pollution*, *217*, 589–601.

Perillo, G., Píccolo, C. & Pino Quivira, M. (1999). Estuaries of South America: Their Geomorphology and Dynamics. In: Perillo, Píccolo y Pino Quiviria (Eds.), *Enviromental Science*, 223 p.

Pita, A. L., Giménez, L., Kandratavicius, N., Muniz, P. & Venturini, N. (2017). Benthic trophic status of aquatic transitional environments with distinct morphological and dynamic characteristics on the south-western Atlantic coast. *Marine and Freshwater Research,* Online Early.

Rocha, C., Cardoso, P., Cunha, L., Gomes, C., Ribeiro Jr. R., Pinheiro, R. H., Costa, M. H. & Burbano, R. (2015). Mutagenic Effects of Potassium Dichromate as Evaluated by Means of Animal and Plant Bioindicators. *In vivo, 29*, 729-736.

Rodríguez-Gallego, L. (2008). Trophic state evaluation of four coastal lagoons of Uruguay: land-use optimization to minimize the eutrophication process. MAB, UNESCO.

Rossi, L.F., Luaces, J.P., Browne, M., Chirino, M.G., Merani, M.S., & Mudry, M.D. (2016). *Chaetophractus villosus* as a sentinel organism: Baseline values of mitotic index, chromosome aberrations and sister chromatid exchanges. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 796*, 40–45.

Saitou, N., Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution, 4*(4), 406-425.

Sarkar, A. (2011). Assessment of the impact of xenobiotic pollutants on the marine organisms: molecular biomarker approach. In: Bhattacharya, B.; Ghosh, A. Majumdar, S. K. (Eds.). *Environmental Pollution: Ecological Impacts, Health Issues and Management* (pp. 70-81). Calcutta, India: Institute of Ecotoxicology and Environmental Sciences and Mudrakar.

Sarkar, A., Bhagat, J. & Sarker, S. (2014). Evaluation of impairment of DNA in marine gastropod, *Morula granulata* as a biomarker of marine pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 106*, 253-261.

Seed, R. (1983). Structural organization, adaptive radiation, and classification of molluscs. In: Hochachka, P.W. (Ed.). *The Mollusca, vol. 1* (pp. 1–54). New York: Academic Press.

Shugart, L. R, Bickham, J., Jackim, G., McMahon, G., Ridley, W., Stein, J. & Steinert, S. (1992). DNA alterations. In Huggett, R. J, Kimerly, R. A., Mehrle, P. M., Jr. & Bergman, H. L. (Eds.). *Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress* (pp. 155–210). Chelsea, MI: CRC/Lewis Publishers.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. & Shneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research, 175*, 184-191.

Slobodskova, V. V., Solodova, E. E., Slinko, E.N. & Chelomin, V. P. (2010). Evaluation of the Genotoxicity of Cadmium in Gill Cells of the Clam *Corbicula japonica* using the Comet Assay. *Russian Journal of Marine Biology, 36*, 311–315.

Spósito, M. (2015). Evaluación del estado trófico y ecológico del compartimiento bentónico en tres estuarios de la costa uruguaya mediante el uso de indicadores bioquímicos y biológicos (Tesis de grado). Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo, Uruguay

Stahl, R. G. Jr. (1997). Can mammalian and non-mammalian "sentinel species"; data be used to evaluate the human health implications of environmental contaminants?. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 3*(3), 329-335.

Taban, I. C., Bechmann, R. K., Torgrimsen, S., Baussant, T. & Sanni, S. (2004). Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. *Marine Environmental Research, 58*, 701–705.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution, 28*, 2731-2739.

Thouzeau, G., Robert, G. & Ugarte, R. (1991). Faunal assemblages of benthic mega-invertebrates inhabiting sea scallop grounds from eastern Georges Bank in relation to environmental factors. *Marine Ecology Progress Series, 74*, 61–82.

Tice, R., & Vazquez, M. (1999). Protocol for the application of the pH>13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. *ILS: The pH>13 Alkaline SCG Assay*.

Trannum, H. C., Olsgard, F., Skei, J. M., Indrehus, J., Øverås, S. & Eriksen, J. (2004). Effects of copper, cadmium and contaminated harbor sediments on recolonisation of soft bottom communities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 310*(1), 87-114.

UNEP (United Nations Environment Programme). (1992). Determinations of petroleum hydrocarbons in sediments. (1992). *Reference Methods for Marine Pollution Studies, 20*.

Venturini, N., Muniz, P., & Rodríguez, M. (2004). Macrobenthic subtidal communities in relation to sediment pollution: the phylum-level meta-analysis approach in a south-easterncoastal region of South America. *Marine Biology, 144*, 119–126.

Venturini, N., Pita, A. L., Brugnoli, E., García-Rodríguez, F., Burone, L., Kandratavicius, N., Hutton, M. & Muniz, P. (2012). Benthic trophic status of sediments in a metropolitan area (Rio de la Plata estuary): linkages with natural and human pressures. *Estuarine, Coastal and Shelf Science, 112*, 139–152.

Venturini, N., Bícego, M. C., Taniguchi, S., Sasaki, S. T., García-Rodríguez, F., Brugnoli, E. & Muniz, P. (2015). A multi-molecular marker assessment of organic pollution in shore sediments from the Río de la Plata Estuary, SW Atlantic. *Marine Pollution Bulletin*, 91, 461–475.

Villar, S., Kandratavicius, N., Martínez, S. & Muniz, P. (2015). Single cell gel electrophoresis as a tool to assess genetic damage in *Heleobia cf. australis* (Mollusca: Gastropoda) as sentinel for industrial and domestic pollution in Montevideo bay (Uruguay). *Brazilian Journal of Oceanography*, 63(3), 347-354.

Villela, I. V., Oliveira, I. M., Silva, J. & Henriques, J. A. P. (2006). DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutation Research, 697*, 78–86.

Villela, I. V., Oliveira, I. M., Silveira, J. C, Dias, J. F, Henriques, J. A. P & da Silva, J. (2007). Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaiba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutation Research, 628*, 76-86.

Walker, C. H. (2009). *Organic pollutants: an ecotoxicological perspective* 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press.

Widziewicz, K., Kalka, J., Skonieczna, M. & Madej, P. (2012). The Comet Assay for the Evaluation of Genotoxic Potential of Landfill Leachate. *The Scientific World Journal*, *v2012*, 1-7,

World Health Organization (W.H.O.). Geneva, 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental health criteria; *ICPS, N° 155*.

Yin, X. H., Zhu, G. N., Li, X. B. & Liu, S.Y. (2009). Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by Comet assay and Micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 680*, 2-6.

Zar, J. H. (2010). *Biostatistical analysis (5th Edition)*. New Jersey, U.S.A.: Pearson Prentice Hall.