



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR fcien.edu.uy



PEDECIBA



ANII
Agencia Nacional de
Investigación e Innovación

Caracterización del humedal de Playa Penino: Aportes de la Genética Toxicológica

Tesis de doctorado

Autora: Mag. Silvia Villar

Orientador: Dr. Alvaro Novello

Tribunal: Dr. Enrique Lessa, Dra. Graciela García, Dr. Guillermo Chalar

“Me he dado cuenta que incluso aquellos que dicen creer en que todo está predestinado y que no podemos hacer nada para cambiarlo, miran antes de cruzar la carretera.”

Stephen Hawking

Agradecimientos:

A mi familia, amigos y compañeros que me dieron su apoyo en el desarrollo de esta tesis.

A mi tutor, por confiar en mí.

INDICE

Resumen	1
Introducción	3
Integridad Ecosistémica	3
Eutrofización	4
CONTAMINANTES: Biodisponibilidad, bioacumulación y biomagnificación	5
Fuentes de contaminación	6
Efluentes domésticos líquidos	8
Importancia de los humedales	10
CARACTERIZACIÓN AMBIENTAL: biomonitores y bioindicadores	12
El género <i>Ctenomys</i> como biomonitor	14
Caracterización ambiental: Aportes de la GENÉTICA TOXICOLÓGICA	15
Mutaciones	16
Mutación somática	16
Mutación germinal	17
Técnicas de estudio de genotoxicidad	18
Ensayo de electroforesis en células individuales	18
Test de micronúcleos	21
<i>Allium</i> test	23
Bibliografía	26
HIPOTESIS	33
OBJETIVOS	34
Sección IA. Caracterización del mayor humedal de Playa Penino	35
Estado actual	35
METODOLOGÍA	39
Área de estudio	39
Obtención de muestras	40
Citotoxicidad	40
Ensayo de electroforesis en células individuales	42

Test de Micronúcleos	43
Muestreo de agua, suelo y sedimento	44
<i>Allium</i> test	44
Determinación de parámetros físico-químicos	45
Análisis de aguas	46
Amonio	46
Nitrógeno total	46
Fósforo total	46
Nitrato	46
Fosfato	47
Análisis de suelos y sedimentos	47
Colecta de ejemplares vegetales	47
Análisis de presencia/ausencia de agrotóxicos por cromatografía gaseosa	48
Tratamiento de sedimentos para espectrometría de masas	49
Análisis microbiológico	51
Coliformes totales y fecales	51
Lámino-cultivos	53
Análisis estadísticos	53
Resultados	54
Ensayo de electroforesis en células individuales	54
Test de micronúcleos	55
Análisis de <i>Allium</i> test	56
Determinación de parámetros físico-químicos	58
Determinación de plaguicidas y micronutrientes	61
Parámetros microbiológicos	61
Análisis de correlación y MDS	63
Discusión	65
Biomarcadores de genotoxicidad	65
Parámetros ambientales	67
<i>Ctenomys pearsoni</i> como centinela	76
Bibliografía	77
Sección IB: Gradiente de impacto de efluentes domésticos en Playa Penino	82
Resultados	85
Ensayo de electroforesis en células individuales	85
Determinación de parámetros físico-químicos	87

Parámetros microbiológicos	89
Escalamiento multidimensional	90
Discusión	91
Biomarcadores de genotoxicidad	91
Parámetros físico-químicos y microbiológicos	92
Análisis de escalamiento multidimensional	94
Bibliografía	94
Sección IC. Saneamiento y biomarcadores de daño genético en <i>Ctenomys</i>	96
Resultados	97
Ensayo de electroforesis en células individuales	97
Test de micronúcleos	98
Biomarcadores de daño genético en Carrasco y Penino	99
Sección II. Ensayo de reparación de ADN e inmunolocalización de p53 y BRCA1 en linfocitos de <i>Ctenomys</i>	103
Reparación del material genético	103
Proteínas BRCA1 y p53	104
BRCA1	104
p53	108
Agentes genotóxicos: Bleomicina	110
Agentes genotóxicos: MMS	111
Cinética de reparación: Ensayo cometa	112
Objetivos de la Sección II	112
Metodología	113
Cultivo de linfocitos	113
Ensayo de cinética de reparación	113
Experimentos de inmunocitoquímica	114
Resultados	115
Ensayo de cinética de reparación	115
Análisis de la localización de p53 y BRCA1	119
Bleomicina	119
MMS	123
Discusión	127
Bibliografía	131
Glosario	134
	135

ANEXO I. El test de micronúcleos en *Ctenomys*

Bibliografía	141
DISCUSIÓN GENERAL	143
Conclusiones	145
Perspectivas	146
Bibliografía	148

Resumen

La caracterización ambiental tradicionalmente se ha centrado en el análisis de la variabilidad en la abundancia y riqueza de especies, la modificación de las comunidades o las respuestas fisiológicas de grupos de organismos a parámetros físico-químicos (pH, materia orgánica, demanda biológica de oxígeno, demanda química de oxígeno, presencia y concentración de sustancias tóxicas). En otros países desde hace varios años, la comunidad científica ha utilizado biomarcadores de daño genético para determinar (a niveles subletales y previos al desarrollo de síntomas a nivel individual o de modificaciones en la estructura de poblaciones o comunidades), los efectos de una gran variedad de agentes xenobióticos sobre organismos nativos, de laboratorio o incluso sobre seres humanos. En Uruguay, sin embargo, los biomarcadores de genotoxicidad aún no se han incorporado como herramientas rutinarias para la caracterización ambiental o para el monitoreo biológico.

La Genética Toxicológica aporta varios tipos de marcadores de daño genético de exposición aguda y crónica, así como de efecto, que se utilizan en análisis *in vitro* e *in vivo* sobre diversos organismos, que habitan ambientes de especial interés por su valor natural, pecuario o por las consecuencias sanitarias o ecológicas que los eventos de contaminación podrían generar.

En esta tesis se realiza la caracterización ambiental del principal humedal de la Playa Penino (Departamento de San José) mediante el uso de biomarcadores de daño genético aplicados a organismos centinela (*Ctenomys*), mediante exposición *in vitro* de Liliáceas en ensayos validados, así como a través de parámetros físico-químicos vinculados a la carga de nutrientes y microorganismos patógenos. En el análisis de la relación entre los parámetros biológicos y ambientales, se concluye que la descarga de efluentes domésticos líquidos estaría vinculada a los altos índices de daño genético revelados por los biomarcadores utilizados. Los niveles de daño genético registrados, superan a los hallados en trabajos realizados en el sur de Brasil para el mismo centinela. Los niveles de genotoxicidad registrados en Playa Penino (área protegida sin saneamiento) superan a los registrados en individuos de la zona urbanizada de Carrasco (con saneamiento).

Se estudia en profundidad uno de los marcadores de daño genético en *Ctenomys*; el test de micronúcleos, debido a la importancia que reviste el bazo en el

alcance de esta herramienta, para detectar daño crónico o crónico reciente en eritrocitos de sangre periférica. Los resultados indican que dicho test revela daño crónico reciente (exposición de lapsos cortos).

Por otro lado, se profundiza el análisis de la capacidad de reparación que estos organismos presentan frente a la acción de agentes mutagénicos conocidos (bleomicina y MMS) y el comportamiento de complejos proteicos fundamentales en la replicación, transcripción, ciclo celular y reparación del ADN (BRCA1 y p53). Ambas poblaciones utilizadas reparan el daño provocado por agentes mutagénicos en un lapso de 24 horas. Las proteínas p53 y BRCA1 se acumulan en el núcleo en forma temprana luego de producirse la exposición, visualizándose las señales en el citoplasma entre las 12 y las 24 horas, probablemente por la exportación del núcleo al citoplasma debido a modificaciones postraduccionales (proteínas ubiquitinadas o no fosforiladas que se degradan en el proteosoma). Las diferencias en los niveles de daño genético analizados a través de los marcadores de genotoxicidad, reflejan por ende, deterioro del ecosistema en Playa Penino y no se relacionan con diferencias en la maquinaria de reparación o control del ciclo celular.

INTRODUCCIÓN

INTEGRIDAD ECOSISTÉMICA

Se ha definido integridad ecosistémica como la capacidad de un ecosistema para mantenerse balanceado, integrado y adaptado a sus condiciones externas (Karr, 1996), manteniendo su organización; su estructura y su función. La estructura se refiere a las interrelaciones entre los diferentes elementos del sistema, y la función a las actividades o procesos que ocurren dentro del sistema (Kay, 1991). Por ello, es necesario integrar estudios tendientes a analizar características funcionales de los ecosistemas (como descomposición de materia orgánica o aporte de nutrientes) y estructurales (disminución de ciertas especies o alteraciones de las mismas) (Gessner y Chauvet, 2002). Adicionalmente, la resiliencia del ecosistema es su habilidad de recuperarse frente a una perturbación (Jørgensen, 2005).

Existen numerosos indicadores para analizar el estado de un ecosistema y la elección de los mismos dependerá de los objetivos que se persigan; la búsqueda de alteraciones tempranas, cumplimiento de límites establecidos por la ley, establecimiento de medidas de manejo y otros. Dichos indicadores deben cumplir con algunos requisitos indispensables: a) ser sensibles a cambios en etapas tempranas de modificación antrópica; b) ser económicos; c) ser sencillos de muestrear y medir; d) ser repetibles. La estructura de las comunidades (número de taxa, cantidad de individuos por taxón, presencia de grupos especialmente tolerantes a condiciones de perturbación o posteriores a ellas), la abundancia o índice de crecimiento de ciertas especies, presencia/ausencia de una o varias especies indicadoras, distribución de especies, familias, y grupos de organismos, relaciones entre los mismos, concentración de sustancias químicas, indicadores de flujos de energía y materia entre estructuras del sistema, alteraciones morfológicas, fisiológicas, celulares o genéticas de poblaciones que habitan los ecosistemas en estudio son ejemplos de indicadores (Schmitt y Osenberg, 1996; Pinilla, 1998; De Azevedo y Da Matta, 2004; Quiroga, 2007).

Una de las principales formas de caracterizar un sistema acuático es a través de la determinación de su estado trófico. Si bien el proceso de colmatación de un ecosistema, producto del incremento gradual de la carga de nutrientes ocurre naturalmente (Lampert y Sommer, 1997), en las últimas décadas, la intensa actividad humana (aumento de la población, desarrollo industrial y ciertas prácticas

agrícolas) han acelerado el proceso de eutrofización (Hosper, 1997; Mazzeo y cols, 2002). Tradicionalmente, las categorías tróficas están relacionadas con los valores de productividad primaria, biomasa de los productores primarios y carga o concentración de nutrientes en el agua (Chalar y cols, 2010). La clasificación de estados tróficos de un sistema acuático tiene una enorme importancia para muchos objetivos prácticos como el uso del agua, el manejo de efluentes y la restauración de los ecosistemas (Chalar y cols, 2011).

EUTROFIZACIÓN

El término “eutrofización” se utiliza para describir los efectos biogeofísicos y biológicos en un ecosistema acuático, derivados de un incremento en el suministro y disponibilidad de nutrientes, en especial nitrógeno y fósforo. Eutrofo se llama a un ecosistema caracterizado por una abundancia anormalmente alta de nutrientes. Se dice que dicho ambiente se encuentra forzado, bajo tensión o sometido a stress. Las principales causas antropogénicas de procesos de eutrofización se pueden agrupar de la siguiente manera: a) descarga de aguas servidas, ricas en nutrientes; b) uso excesivo de fertilizantes, que aportan grandes cantidades de nitrógeno (en forma de sales de nitrato y amonio) y fósforo (como fosfato) y; c) la eliminación de la vegetación y la erosión en suelos agrícolas que producen arrastre de nutrientes por escorrentía (Bennett y cols, 1999; Mazzeo y cols, 2002; RAPAL, 2010).

En un cuerpo de agua cerrado, por ejemplo una laguna, el proceso de eutrofización puede terminar por convertirla en tierra firme. Esto ocurre porque los nutrientes que ingresan masivamente al sistema generan una gran biomasa de organismos de vida generalmente efímera, que al morir se acumulan sobre el fondo y no son totalmente consumidos por organismos descomponedores (especialmente bacterias). Procesos naturales de eutrofización se pueden observar claramente en lagos y lagunas que se transforman en pantanos y posteriormente se cubren de vegetación (Niyogi y cols, 2003). Aunque tanto el nitrógeno como el fósforo contribuyen en este proceso, la clasificación del estado trófico normalmente se basa en el nutriente que representa una limitante. En el agua, la presencia de especies de algas capaces de fijar nitrógeno es bastante común y los iones nitrato son bastante abundantes por procesos de escurrimiento procedentes de los suelos, por ende, el nitrógeno no es un nutriente limitante en sistemas acuáticos como los humedales. El fósforo por otra parte, no tiene suministro atmosférico, ya que no aparece de forma natural en fase gaseosa. Incluso, el escurrimiento es normalmente bajo ya

que el fosfato debido a sus cargas negativas, se une fuertemente a las partículas del suelo. En las aguas superficiales la mayoría del fósforo se encuentra en la biomasa del fitoplancton, por tanto, la biodisponibilidad del fósforo depende del reciclado de la biomasa por parte de las bacterias (Gutiérrez, 2000; Mazzeo y cols, 2002; Spiro y Stigliani, 2004; Newman y Clements, 2008).

CONTAMINANTES: Biodisponibilidad, bioacumulación y biomagnificación

Un contaminante es un elemento o compuesto químico situado lejos de su lugar de origen, o presente en concentraciones mayores de las normales que en general tiene un efecto adverso sobre alguno o varios organismos. Puede tener un origen natural o antrópico (CMA-JA, 1999).

El grado de toxicidad de una sustancia representa la intensidad de los efectos nocivos que un agente contaminante produce en los organismos. Una sustancia del medio pueda ser asimilada por un organismo cuando está *biodisponible*. Normalmente sólo una fracción de la sustancia o compuesto existente en el medio es biodisponible y su efecto puede ser positivo, negativo, o indiferente para cada organismo específico, lo que dependerá de las condiciones ambientales, de la forma química en la que se encuentre dicho xenobiótico y de la capacidad de los organismos para absorberlos, ingerirlos y metabolizarlos (Schmitt y Osenberg, 1996; CMA-JA, 1999; Buchwalter y cols, 2003; Newman y Unger, 2003).

Los elementos biodisponibles pueden ser acumulados en el organismo (*bioacumulación*) en varios órdenes de magnitud mayores que la concentración encontrada en el ambiente, y pueden persistir durante bastante tiempo influyendo en la peligrosidad potencial o futura (Damiá Barceló y López de Alda, 2008).

Los contaminantes del suelo pueden moverse hacia otros compartimentos ambientales por volatilización, disolución, lixiviado o erosión, y pasar a los organismos cuando pueden ser *bioasimilables*, lo que normalmente ocurre cuando se encuentran en forma más o menos soluble. En general, la peligrosidad de un contaminante depende de la persistencia. En ciertos casos, el ambiente ejerce funciones de filtración, descomposición, neutralización o almacenamiento de ciertos contaminantes y evita en mayor o menor grado su biodisponibilidad. Pero esta capacidad de depuración no es igual para todos los ambientes (Spiro y Stigliani, 2004; Cicerone y cols, 2007; Newman y Clements, 2008; Pacheco, 2008).

La *biomagnificación* se produce a nivel del ecosistema; ocurre cuando la concentración de un contaminante aumenta en función del “ascenso” en los eslabones tróficos presentes en el ecosistema (Cicerone y cols, 2007).

FUENTES DE CONTAMINACIÓN

Cuando los contaminantes no tienen un punto claro de ingreso en los cursos de agua que los reciben, se dice que la contaminación de las aguas procede de fuentes no localizadas (“difusas”). Cuando determinadas actividades generan aguas residuales que a través de cañerías, pozo, conducto, canal, contenedor, fisura o tubería de descarga por ejemplo, llegan a aguas receptoras se denominan fuentes de contaminación localizadas (“puntuales”) (FAO, 1997; Pérez, 2008).

Los contaminantes de procedencia no localizada, cualquiera que sea la fuente, se desplazan por la superficie terrestre o penetran en el suelo, arrastrados por el agua de lluvia. Estos contaminantes llegan a las aguas subterráneas, tierras húmedas, tributarios, lagos y finalmente, hasta los océanos en forma de sedimentos y cargas químicas transportadas por los ríos (Morlans, 2010).

En términos generales los procesos que movilizan sustancias (incluidos contaminantes) de un compartimento ambiental a otro son los siguientes (INE, 2006):

- ✓ **Infiltración:** La velocidad de infiltración, es decir la velocidad con que el agua superficial penetra en el suelo (cm/h), es uno de los términos más comunes de las ecuaciones hidrológicas utilizadas para calcular la escorrentía superficial. La infiltración varía entre distintos episodios de lluvia y dentro de cada uno de ellos, en función de factores como la humedad previa del suelo, la vegetación existente, etc. En general, la velocidad de infiltración comienza con un valor elevado durante una precipitación, y disminuye a un valor bajo cuando el suelo se ha saturado.
- ✓ **Escorrentía superficial:** Las lluvias de gran intensidad suelen producir abundante escorrentía superficial, pues la intensidad de precipitación supera la velocidad de infiltración. La destrucción de la vegetación superficial protectora y la compactación del suelo, da lugar a importantes fenómenos de erosión provocada por el gran volumen de la escorrentía superficial.
- ✓ **Aguas subterráneas:** Las aguas subterráneas se alimentan del agua que atraviesa los horizontes edafológicos y penetra en el material subyacente y/o

roca madre que se encuentra por debajo del suelo. Las aguas subterráneas suelen fluir hacia el cauce de un río, donde afloran y alimentan su caudal durante los períodos en que las lluvias son escasas o nulas. Este componente del caudal de los cursos de agua se llama "caudal base". La química del caudal base es consecuencia de la geoquímica del suelo y de la roca madre, y de las sustancias que hayan podido llegar a las aguas subterráneas por lixiviación.

La contaminación puntual debida a efluentes domésticos e **industriales** generan un impacto importante sobre las fuentes de agua en Uruguay. En nuestro país, se han desarrollado varios estudios vinculados con el proceso de eutrofización, provocados por fuentes puntuales de contaminación en diversos sistemas fluviales, que constituyen la base de los monitoreos biológicos en aguas continentales. Para cumplir con los objetivos de vigilancia para la calidad de agua, **grupos** académicos de la Universidad en conjunto con la Dirección Nacional de Medioambiente (DINAMA) han desarrollado monitoreos biológicos y fisico-químicos en un programa de monitoreo de cursos de agua. Estos estudios incluyen la cuenca del Rio Santa Lucía, localizado al sur de Uruguay ($34^{\circ}41' - 34^{\circ}51'S$; $54^{\circ}59' - 57^{\circ}7'W$), que cubre un área de 13,310 km² y que provee de agua potable a dos millones de habitantes del área metropolitana de Montevideo (Pintos y cols, 1993; Arocena y Mazzeo, 1994; Chalar, 1994; Arocena, 1996, 1998; Arocena y cols, 2000; Scasso y cols, 2001; Conde y cols, 2002; De León y Chalar, 2003; Chalar, 2006, 2009; Chalar, 2011). A pesar de que en esta región, la evapotranspiración y la temperatura varían según la temporada, las precipitaciones no, dando lugar a inviernos fríos con alta escorrentía e las inundaciones frecuentes y los veranos cálidos con bajo flujo (Chalar y cols, 2011).

EFLUENTES DOMÉSTICOS LÍQUIDOS

Los efluentes domésticos líquidos, también llamados aguas residuales, derivan de las actividades típicas de cualquier hogar. Si estos residuos líquidos ricos en nutrientes y microorganismos patógenos no son sometidos a procedimientos adecuados de recolección, tratamiento y eliminación, producirán un impacto en el entorno acuático y en los recursos hídricos, así como en el suelo. De igual modo, la eliminación incorrecta de los residuos sólidos, como envases y otros objetos suponen una amenaza grave para dichos ambientes (Newman y Clements, 2008;

Red Ara, 2011). El crecimiento de la población, sobre todo en los asentamientos urbanos y la menor disponibilidad de recursos de muchos municipios de los países en desarrollo, contribuyen a agravar estos problemas (OMS, 2000; Pepe y Lombardi, 2003; OMS, 2004).

En los países desarrollados y en muchos en vías de desarrollo, casi todas las excretas humanas se recogen por medio de alcantarillados, fosas sépticas u otro tipo de sistemas de saneamiento. Esto proporciona un nivel sanitario adecuado en los hogares, sin embargo, se vierte al entorno una cantidad considerable de aguas residuales con muy poco tratamiento previo. En los países en desarrollo, solo un pequeño porcentaje de la población total, aproximadamente 10%, sobre todo a nivel urbano, tiene acceso a los sistemas de alcantarillado (Pepe y Lombardi, 2003). A su vez, una proporción ligeramente mayor, del orden de 20%, dispone de algún tipo de dispositivo de saneamiento. La gran mayoría (alrededor de 65%) de la población de los países en desarrollo, no dispone de sistemas de saneamiento adecuados. El contenido de las letrinas vertido a pozos negros se filtra normalmente hasta las aguas subterráneas (OMS, 2000; Pepe y Lombardi, 2003; OMS, 2004; Iida y Shock, 2009).

De acuerdo al Programa para el Ambiente de las Naciones Unidas (en sus siglas en inglés United Nations Environment Program), Uruguay registra solo un 20% de tratamiento primario de aguas respecto al total de aguas residuales vertidas a cuencas (Keys y cols, 2012). De acuerdo a la UNEP (Keys y cols, 2012), la disminución en la calidad del agua afecta el bienestar humano en dos formas: directamente a través del consumo de agua en condiciones que no cumplen la reglamentación nacional o internacional e indirectamente, degradando otros ecosistemas como los humedales, las lagunas y los ríos. En este sentido, cabe destacar que la UNEP identifica a los humedales como ecosistemas que regulan el flujo hídrico en muchas zonas geográficas, son reservóreo en épocas de sequía y constituyen un filtro natural de nutrientes y polutos, particularmente nitrógeno y fósforo de origen antrópico.

El agua es un recurso indispensable para la vida que debe ser preservado, evaluado y controlado para garantizar su calidad. La disponibilidad del agua apta para la preparación de alimentos, la higiene personal y doméstica, la agricultura, pesca y la recreación, es fundamental para garantizar la salud humana. La contaminación del agua con excretas puede producir las llamadas enfermedades entéricas, en las que la infección se origina en el tubo digestivo y los

microorganismos causantes se eliminan por las heces (Silva y cols, 2004; Olivia y Pérez, 2005).

En este sentido, el vertimiento de aguas servidas produce dos hechos notables desde un punto de vista sanitario: a) la incorporación de un gran número de microorganismos pertenecientes a la flora fecal, y b) la incorporación de materias orgánicas fecales. El primero de ellos justifica el empleo de indicadores microbiológicos mientras que la incorporación de materias fecales deberá condicionar el tipo de indicadores químicos. Algunos indicadores químicos de contaminación fecal que han sido considerados clásicamente son: materia orgánica (demanda biológica de oxígeno, demanda química de oxígeno y carbono orgánico disuelto), nitratos, nitritos y amonio. Estos tres últimos se producen en los procesos de desaminación y nitrificación que sufre la materia orgánica tras la contaminación fecal, a expensas de la propia flora microbiana de las heces. El amonio, al producirse en el primer paso de la mineralización, constituye para algunos autores un indicador químico indirecto de contaminación fecal en las aguas (Newman y Clements, 2008; Márquez y cols, 2007). En cuanto a los nitratos, se consideran como indicadores de contaminación fecal repetida, pues es el estado más oxidado del amonio (Newman y Clements, 2008; Márquez y cols, 2007).

En relación a los microorganismos indicadores de calidad de agua, existen grupos de microorganismos denominados *indicadores de calidad sanitaria*, entre los que se cuentan los siguientes grupos: coliformes totales, coliformes fecales y aerobios mesófilos (los cuales son heterótrofos, aerobios o anaerobios facultativos, capaces de crecer en cualquier medio de agar nutritivo). El grupo de bacterias coliformes ha sido siempre el principal indicador de calidad de los distintos tipos de agua; el número de coliformes en una muestra, se usa como criterio de contaminación y por lo tanto, de calidad sanitaria de la misma. Los coliformes son bastones Gram-negativos, aerobios o anaerobios facultativos, que fermentan la lactosa con formación de gas cuando se incuban durante 48 horas a 35°C. Incluye los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y especies lactosa positiva de otros géneros (Silva y cols, 2004; Vilchez, 2010; FPTCDW, 2011). Esto provee información importante sobre la fuente y el tipo de contaminación presente (Silva y cols, 2004; Vilchez, 2010; FPTCDW, 2011).

El examen bacteriológico del agua usualmente involucra métodos tradicionales como el vertido en placa o métodos más modernos como el uso de lámino-cultivos, para la estimación de los coliformes y aerobios mesófilos (Silva y

cols, 2004; Vilchez, 2010; FPTCDW, 2011). Los coliformes fecales se denominan termotolerantes por su capacidad de soportar temperaturas elevadas. Esta es la característica que diferencia a los coliformes totales de los fecales. La capacidad de los coliformes fecales de reproducirse fuera del intestino de los animales homeotérmicos, es favorecida por la existencia de condiciones adecuadas de materia orgánica, pH y humedad. En agua, los coliformes totales funcionan como una alerta de que ocurrió contaminación, sin identificar el origen. Su presencia intensifica la vigilancia sobre la calidad de la misma (Silva y cols, 2004; Newman y Clements, 2008; Vilchez, 2010; FPTCDW, 2011).

Importancia de los humedales

Los servicios ecosistémicos son aquellos beneficios que las personas obtienen de los ecosistemas. Estos pueden ser de dos tipos: directos e indirectos. Se consideran beneficios directos la producción de provisiones –agua y alimentos– (servicios de aprovisionamiento), la regulación de ciclos como las inundaciones, degradación de los suelos, desecación y salinización (servicios de regulación). Los beneficios indirectos se relacionan con el funcionamiento de procesos del ecosistema que generan los servicios directos (servicios de apoyo), como el proceso de fotosíntesis y la formación y almacenamiento de materia orgánica; el ciclo de nutrientes; la creación y asimilación del suelo y la neutralización de desechos tóxicos. Los ecosistemas también ofrecen beneficios no materiales, como los valores estéticos y culturales, o las oportunidades de recreación (Kandus y cols, 2010; Valdez y Ruiz, 2012).

En términos generales los humedales son ecosistemas donde la inundación temporal o permanente es el factor determinante del tipo de comunidades biológicas. **El agua (dulce o salada) es el agente principal que crea condiciones particulares para los organismos que allí viven; son ecosistemas de transición (ecotonos) entre un ecosistema terrestre y otro acuático** (Spiro y Stigliani, 2004) o ecosistemas únicos más o menos cerrados. Antiguamente, los humedales eran considerados tierras “inútiles”, de baja productividad, de proliferación de roedores y de mosquitos y por tal motivo fueron objeto de obras de ingeniería para transformarlos, ya sea desecándolos (por ejemplo el canal Andreoni en Rocha, o los bañados de Carrasco), construyendo diques o rellenándolos con el fin de que tuvieran usos agrícolas/pecuarios u otros usos productivos. Con el transcurso de los

años, la percepción sobre los humedales ha ido cambiando y diversas investigaciones fueron descubriendo el valor ecosistémico de los mismos, lo que motivó que se implementarán programas nacionales e internacionales para su conservación (SNAP, 2006).

Entre los servicios ecosistémicos que brindan los humedales se encuentra el trabajo artesanal basado en el uso de hidrófitas como juncos o totoras para elaborar cestos, alfombras y demás productos. Los recursos del humedal también se utilizan para la construcción de casas; maderas de árboles, juncos para paredes y techos (quinchos). Los humedales brindan una gran cantidad de beneficios económicos al ser humano, como el abastecimiento de agua y de recursos alimenticios (peces, mamíferos, etc), beneficios para la agricultura (gracias al mantenimiento de las napas freáticas y a la retención de nutrientes en las llanuras inundables que posibilitan el pastoreo), producción de madera, obtención de turba, posibilidades educativas, recreativas y de turismo. A nivel ecosistémico, los humedales son “áreas vitales” para los ambientes costeros y continentales (Pantanal por ejemplo) en términos de oferta de hábitat y recursos para organismos terrestres y acuáticos, también reducen la acción erosiva del agua. La vegetación actúa como reservorio temporario y agente de movilización de nutrientes y contaminantes del sedimento (De Groot y cols, 2002; Quetier y cols, 2007).

Los dos problemas más importantes que actualmente enfrentan las áreas costeras son la eutrofización y la rápida disminución de las poblaciones (peces, crustáceos y otros). Desafortunadamente, a pesar de los progresos conseguidos en los últimos decenios, los humedales figuran entre los ecosistemas más amenazados de la Tierra, sobre todo a causa de su continua desecación, transformación y contaminación, así como por la explotación excesiva de sus recursos (Binning y cols, 2001; Spiro y Stigliani, 2004; SNAP, 2006).

Los humedales son reservorios de biodiversidad dado que más del 40% de las especies del mundo y el 12% de las especies animales los habitan. Dicha biodiversidad es una importante fuente de genes con enorme potencial tanto para la salud como desde el punto de vista económico, por ejemplo para la industria farmacéutica o alimenticia. Se estima que en la producción de medicamentos, se utilizan más de 20 mil especies de plantas medicinales, muchas de ellas provenientes de humedales. A su vez, las dos terceras partes del pescado consumido en el mundo dependen de humedales costeros en alguna etapa de su ciclo (Mitsch y Gosselink; 1986; Binning y cols, 2001; Urdiales, 2006; SNAP, 2006).

CARACTERIZACIÓN AMBIENTAL:

Biomonitores y biomarcadores

Muchas sustancias de origen antrópico potencialmente dañinas son liberadas al ambiente en forma constante. Identificar la acción de agentes peligrosos se ha convertido en una tarea exhaustiva y a pesar de los numerosos métodos analíticos disponibles, coleccionar y analizar muestras suficientes en tiempos razonables, continúa siendo un gran obstáculo en el estudio de daños ambientales. Para medir contaminación, hay una gran variedad de herramientas, incluso existen índices de polución estandarizados que pueden indicar tasas de bioacumulación de determinados tóxicos como metales pesados (Wenner, 1988), aunque muchos autores no están de acuerdo con el uso de índices únicos para la caracterización ambiental (Schmitt y Osenberg, 1996). Existe una preferencia generalizada por la medición de abundancia de especies que permite el submuestreo de una población sobre largos períodos de tiempo sin alterarla (Farrington y cols, 1987). Otros investigadores eligen las especies de acuerdo a la amplitud en su distribución o la resiliencia a las perturbaciones ambientales (algunos autores recomiendan el uso de bivalvos, sobre peces o crustáceos debido a su alta tolerancia a las toxinas) (Schmitt y Osenberg, 1996). Para algunos propósitos como la determinación de efectos subletales donde la exposición *in vitro* o en dispositivos especiales (ej. limnotrampas) es necesaria, se escogen especies fáciles de mantener en condiciones de laboratorio (*bioensayos*) (Farrington y cols, 1987). Sin embargo, si el objetivo del estudio es determinar el impacto de la polución sobre las poblaciones naturales en un área determinada, la exposición *in vitro* tiene escaso valor, ya que la mezcla de variables ambientales naturales y antrópicas que actúan sobre un organismo en un ambiente dado, no pueden reproducirse *in vitro*. En este sentido, el monitoreo ambiental que se realiza a través de organismos expuestos (*biomonitores o centinelas*), utilizando tests en sistemas biológicos (*biomarcadores*), se han convertido en herramientas fundamentales para la identificación de polutos capaces de causar daño ambiental o sanitario en etapas tempranas de los eventos de contaminación (Butterworth, 1995; da Silva y cols, 2003).

Algunos contaminantes, o mezclas de ellos, provocan a los organismos en forma directa, un efecto agudo de rápida detección. Sin embargo, otros xenobióticos causan efectos crónicos, que se detectan muchos años después de que ocurre la exposición, dificultando la asociación del daño con los agentes que lo

causan. Para analizar dicha exposición, son muy importantes los estudios con biomarcadores de exposición y efecto crónico. Los estudios *in situ* (en el ambiente donde la exposición ocurre), resultan fundamentales debido a que la toxicidad de las mezclas de contaminantes puede verse aumentada sinérgicamente en relación a los componentes testados individualmente (Petras y cols, 1995; Ronco y cols, 2004).

En la selección de un biomonitor o centinela los principales aspectos a tener en cuenta va a depender del objetivo de la investigación: a. deben compartir el ambiente con el hombre (si el objetivo es sanitario); b. deben presentar una respuesta temprana a los tóxicos (si el objetivo es proteger un ecosistema); y c. deben desarrollar patologías similares como respuesta a los efectos de los mismos xenobióticos (para que los resultados sean comparables). La principal ventaja de utilizar organismos centinela para el monitoreo ambiental, comparado con el uso exclusivo de parámetros físico-químicos tradicionales, es la información que ellos pueden dar en relación a la exposición acumulativa (tanto a nivel de organismos como poblaciones), en respuestas de letalidad y subletalidad, además de que es posible detectar efectos indirectos (da Silva y cols, 2003; Mudry y Carballo, 2006; Ribeiro, y cols, 2003). Cabe destacar, sin embargo, que muchas investigaciones que utilizan índices asociados a organismos centinela, carecen de contextualización, es decir, información de parámetros ambientales que permitan adjudicar los efectos sobre los organismos, las poblaciones y las comunidades a determinadas causas y eso, representa una desventaja cuando se pretende buscar medidas de mitigación o remediación (Schmitt y Osenberg, 1996) .

Los biomarcadores pueden definirse como sistemas indicadores que generalmente incluyen subsistemas de un organismo completo. También pueden definirse como mecanismos de evaluación de efectos biológicos provocados por polutos en órganos, tejidos o células de un organismo. Muchos tipos de organismos se han utilizado como centinelas en diversos ambientes; gusanos, esponjas, anfibios, peces, plantas (*Allium cepa*, *Tradescantia*, *Vicia faba*). En general, las especies silvestres son utilizadas como centinelas de riesgo ecológico mientras que las especies domésticas son más útiles para la evaluación de riesgos en sanidad humana (Mudry y Carballo, 2006).

El género *Ctenomys* como biomonitor

La conservación requiere de la existencia de conocimientos en una escala ecológica y genética en las cuales las especies responden a modificaciones del hábitat. El género *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae), roedores caviomorfos cuyas especies y poblaciones exhiben una gran diversidad cariológica en la mayoría de los casos, han sido sugeridos como buenos biomonitores o centinelas ya que habitan una gran variedad



de ambientes y las modificaciones que experimenten probablemente afecten la dinámica de la comunidad entera ya que actúan, por ejemplo, dispersando semillas, controlando la proliferación de ciertas gramíneas y son presa de una gran variedad de animales (zorros, rapaces y varios carnívoros). Consecuentemente, los efectos que experimenten las poblaciones de éstos y otros pequeños mamíferos como consecuencia de modificaciones ambientales, tendrán un efecto de cascada en los ambientes que ocupen (Fernandes y cols, 2007).

Cabe destacar además, que a pesar de su gran variabilidad cromosómica, varios estudios indican pérdida de variabilidad genética en ciertas poblaciones, en algunos casos por eventos naturales y en otros, debido a la fragmentación del hábitat por actividades humanas. En el caso de los eventos naturales, podemos citar la erupción de un volcán en Chile que provocó la pérdida de variabilidad en algunas especies de *Ctenomys* (Gallardo, 1995). Como ejemplo de fragmentación del hábitat que este género ocupa, podemos destacar el caso de *C. pearsoni* en Uruguay (Altuna y cols, 1999) y la extinción de poblaciones locales de especies argentinas de tuco tucos debido a actividades antrópicas como ha descrito Bidau y cols. (1996).

La especie *C. torquatus* en Rio Grande del Sur, coincide geográficamente con la distribución de las reservas de carbón. Las poblaciones de esta especie, han sido utilizadas como centinelas para monitorear xenobióticos provenientes de actividades derivadas de la minería de carbón Silva y cols. (2000a, 2000b). *C. torquatus* fue sugerido a través de los resultados obtenidos por dichos autores como un adecuado biomonitor.

Al igual que *C. pearsoni* en Uruguay, *C. flamarioni* y *C. lami* enfrentan serios riesgos de desaparecer debido a la eliminación de dunas por el desarrollo urbano.

Aunque no está incluida en la lista nacional de especies amenazadas, en Brasil esta especie presenta una distribución cuyo rango es muy estrecho (Freitas, 2007). El desarrollo de la agricultura, la urbanización, la erosión de las costas, la extracción de arena, el avance de vegetación exótica y la presencia de animales domésticos, han modificado los ambientes que estos roedores ocupan en Rio Grande del Sur (Tomazelli and Villwock, 2000; Esteves y cols, 2002; Fernández-Stolz, 2007). Como resultado de las actividades humanas, los hábitats nativos se fragmentan o se modifican definitivamente, como consecuencia, la pérdida de hábitat y el aislamiento pueden reducir los tamaños poblacionales a niveles que conduzcan a pérdida de variación genética (Frankham y cols, 1999; Lande, 1995). Fernandes y cols. (2007) consideran que la vulnerabilidad de estos roedores es mayor a la que se supone y enfatizan la importancia de desarrollar estudios a nivel ecológico y genético, para preservarlos.

Aunque *Ctenomys* es un género de roedores fosoriales, normalmente salen a la superficie para alimentarse y limpiar sus cuevas. Por la ingesta de suelo al limpiar sus patas y el consumo de plantas cercanas a fuentes de agua como alimento (cañadas, humedales, arroyos, etc), se exponen a contaminantes presentes en ambos compartimentos ambientales. Heuser y cols., (2002) estudiaron los efectos genotóxicos de exposición crónica a emisiones de motores de combustión interna en la especie *C. minutus*, hallando una clara asociación entre contaminación proveniente del parque automotor y daño genético, revelando que las salidas frecuentes de las cuevas para alimentarse de los tucu tucus genera exposición a contaminación atmosférica, más allá de que muchos xenobióticos aéreos terminan depositándose en el suelo o en la vegetación.

Caracterización ambiental: Aportes de la GENÉTICA TOXICOLÓGICA

El daño genético no es simplemente la reacción del ácido desoxirribonucleico (ADN) a un agente dado. La aparición de una enfermedad genética (teratogénesis, cáncer y otras) debido a un químico ambiental, depende de la concentración de dicho agente en el ambiente, su vía de entrada, la distribución en el organismo, los sistemas metabólicos en los cuales se distribuye, la reactividad del compuesto y sus metabolitos con el material genético, la susceptibilidad y la capacidad de reparación del daño. Por ende, la Genética Toxicológica surge de la

integración de conceptos provenientes de la Genética (mecanismos de herencia) y de la Toxicología (efectos de los xenobióticos sobre los organismos) (Carballo, 2006).

La Genética Toxicológica es la disciplina científica que analiza la acción de agentes tóxicos capaces de interactuar con el material genético de los organismos (denominados compuestos genotóxicos). Es una ciencia multidisciplinaria que pretende establecer la correlación que existe entre la exposición a agentes xenobióticos y la inducción de alteraciones genéticas tanto, en células germinales como en células somáticas de los organismos, y definir a partir de ello, los efectos que las toxinas ambientales producen sobre la integridad genética de los seres vivos, además permite advertir a tiempo situaciones de potencial peligro (ya que los marcadores moleculares de daño genético detectan efectos a dosis subletales) (Casarett y Doull's, 2001)

MUTACIONES

La mutación, en su acepción general, se refiere a cualquier cambio del material genético de las células que no se deba a fenómenos de recombinación o segregación, susceptible de ser transmitido a células hijas dando lugar a células o individuos mutantes. En este sentido, es la fuente primaria de variabilidad genética y como tal es indispensable para que se produzca el fenómeno evolutivo. Sin embargo, existen mutaciones que surgen por la acción de sustancias tóxicas de origen humano, cuyas consecuencias son deletéreas para los organismos tanto a nivel individual como poblacional (Figura 1) (UNEP-ICPEMC, 1992).

Las mutaciones pueden clasificarse como (Oliva y cols, 2008):

Mutación somática

Las mutaciones pueden ocurrir en células somáticas y no se transmitirán a la descendencia de un individuo, salvo que la especie considerada tenga reproducción vegetativa. Si las mutaciones son deletéreas y se producen en células somáticas la sobrevivencia del organismo puede comprometerse por el desarrollo de enfermedades.

Mutación germinal

En las especies con reproducción sexual, la mutación que afecta a la línea celular germinal puede ser transmitida por los gametos a la descendencia, perpetuándose en la población. Los cambios genéticos deletéreos también pueden provocar alteraciones en el embrión durante el desarrollo embrionario, proceso conocido como teratogénesis.

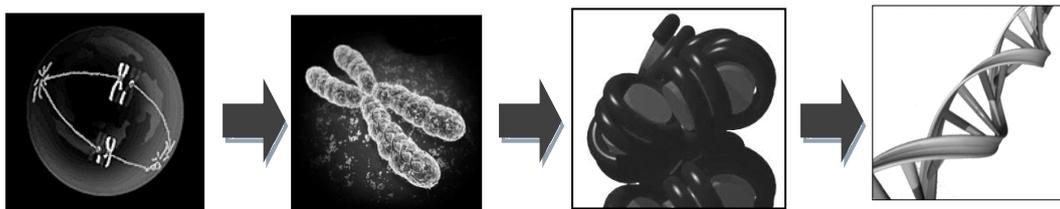


Figura 1. Componentes celulares “blanco” de los agentes mutagénicos (aparato mitótico, cromosoma, cromatina (nucleosoma), ADN)

Los eucariotas, poseen un sistema enzimático, que aunque variable dependiendo del grupo taxonómico y el estadio en el que se encuentra un individuo, así como su condición nutricional y sanitaria, hidroliza, oxida y reduce compuestos extraños, mediante reacciones que se llevan a cabo mediante el sistema de citocromos P-450 que se encuentran en el citoesqueleto y en el retículo endoplásmico. Los productos intermedios así generados en ocasiones se conjugan con proteínas, formándose compuestos altamente reactivos (promutágenos), pero también hay otras enzimas que desintoxican e inactivan a los productos intermedios: el equilibrio entre estas dos funciones celulares es el que en última instancia determina el potencial genotóxico de un compuesto (Miller y cols, 2010). Los agentes genotóxicos pueden provenir de fuentes externas o generarse por procesos metabólicos normales. Por ejemplo, durante el metabolismo normal de las células se generan compuestos que suelen ser muy reactivos, como las nitrosaminas (compuestos mutagénicos que se producen en al reaccionar los nitritos con las aminas) (Oliva y cols, 2008; Miller y cols, 2010).

Los agentes mutagénicos (cualquiera sea su procedencia) interactúan con el ácido desoxirribonucleico (ADN), provocando lesiones premutagénicas, que en muchos casos se fijan y en otros casos se reparan por enzimas que funcionan en los organismos para mantener la integridad y fidelidad de los ácidos nucleicos. Se presume que las enzimas que intervienen en los procesos de reparación, las cuales son muy conservadas, aparecieron pronto en la evolución, ya que están presentes

desde las bacterias hasta los mamíferos (Ribeiro y cols, 2003; Mudry y Carballo, 2006).

Los mecanismos de reparación pueden funcionar antes o después de la replicación del ADN. Su eficiencia varía, reparando eficientemente una lesión, cuando existe una baja exposición a agentes genotóxicos; o bien reparando de manera ineficiente, promoviendo errores en el ADN, lo que depende de la saturación de dicho mecanismo, que generalmente ocurre cuando hay exposiciones altas o persistentes a mutágenos (Figura 2) (Prieto y Papeschi, 2006).



Figura 2. Posibles efectos de las mutaciones con efectos individuales o poblacionales

Técnicas de estudio de genotoxicidad

Ensayo de electroforesis en células individuales

Ostling y Johanson (1984) fueron los primeros en desarrollar la técnica de electroforesis en microgeles, para detectar daño genético a nivel de células individuales. Subsecuentemente, Singh y cols. (1988) introdujeron modificaciones en la etapa de electroforesis de la técnica, donde las condiciones alcalinas ($\text{pH} > 13$), incrementan la migración del ADN, lo cual se asocia con niveles mayores de lesiones (rupturas simple y doble hebra asociadas a reparación incompleta por escisión de nucleótidos, sitios álcali lábiles, etc.). Eso llevó a que la versión alcalina,

fuera la más utilizada a nivel mundial por su mayor sensibilidad para identificar agentes genotóxicos. Esta técnica, también conocida como ensayo cometa se basa en el comportamiento del ADN en células individuales y tiene en cuenta su organización dentro del núcleo. Para ser compactado, luego de enrollarse alrededor de las proteínas histónicas, el ADN forma lazos que se unen a una matriz nuclear proteica (Eriksson y cols, 2002); si las células se encuentran embebidas en agarosa y se lisan sus membranas con detergentes y sus proteínas nucleares (incluyendo las histonas) se extraen con altas concentraciones de sales, el ADN de mayor peso molecular que el resto de los componentes ocupará un espacio en el gel, permaneciendo en una estructura residual denominada nucleoide. Dentro de las pocas proteínas que resisten la extracción, se encuentran las que conforman la matriz nuclear (Olive y Banáth, 1995). En el caso de que exista daño en la molécula de ADN, la estructura del nucleoide cambiará; las hebras y fragmentos resultantes, sometidos a un campo eléctrico migrarán a través del gel, de acuerdo a su tamaño, formando una “cola” (Collins y cols, 2008). Por lo tanto, este ensayo permitirá observar material genético con aspecto de cometa; donde la cabeza corresponde a ADN no dañado, y la cola a ADN fragmentado o alterado en su estructura normal (Figura 3).

Las ventajas que ofrece la técnica del cometa son varias:

- ✓ Sensibilidad para detectar bajos niveles de daño genético.
- ✓ Requerimiento de bajo número de células por muestra (lo que implica que no es necesario que las mismas provengan de cultivos celulares).
- ✓ Flexibilidad (se puede utilizar *in vitro*, *in vivo*, sobre cualquier tipo celular y para testar la acción sobre el material genético de casi cualquier sustancia).
- ✓ Alto rendimiento para ensayos de screening de compuestos con objetivos regulatorios.
- ✓ Factibilidad de uso para diferenciar genotoxicidad de citotoxicidad.
- ✓ Aplicabilidad en cultivos primarios y ensayos *in situ*.

Durante la última década se ha convertido en una herramienta fundamental para la investigación en monitoreo ambiental y humano, así como en el análisis de los procesos de reparación del ADN. Abundan las revisiones referidas a esta técnica Tice y cols. (1991), McKelvey-Martin y cols. (1993), Tice (1995), Fairbairn y cols. (1995), Anderson y cols. (1994), Rojas y cols. (1999) y Speit y Hartmann (1999).

Basándose en el estado actual del conocimiento, paneles de expertos han llegado al consenso sobre la metodología más apropiada cuando se aplica este ensayo para monitoreo *in vivo* e *in vitro*. Bocker y cols. (1997) han reportado que el TMO y el % de ADN dañado (o % de ADN de la cola) muestran mayor sensibilidad al daño genético sobre la base de experimentos de dosis-respuesta frente a diferentes mutágenos. De Boeck y cols. (2000) mostraron que el % de ADN dañado es el parámetro más adecuado para analizar daño genético por su menor variación, basándose en estándares propios. Olive y cols. (1992) sugirieron que dicho parámetro resulta más apropiado para detectar daño en el ADN que el llamado “momento de la cola” (TM). El momento de la cola se define como el producto de la longitud de la cola del cometa y la fracción total del ADN presente en la misma. Este parámetro incorpora una medida que toma en cuenta los fragmentos más pequeños detectables (en la longitud) y el número de piezas rotas o “relajadas” (representadas por la intensidad del ADN). Tomando en cuenta esto, los resultados indicarían mayor cantidad de ADN dañado, pero refleja un tipo de daño que no genera fragmentos demasiado pequeños de ADN como los que aumentan la longitud de las colas de los cometas por roturas simple hebra y sitios álcali lábiles (Olive y cols, 1992; Tapanainen y cols, 2011).

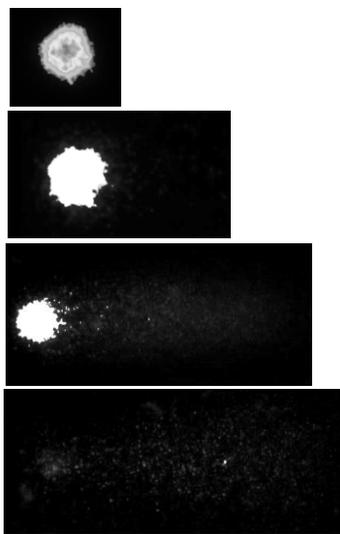


Figura 3. Niveles de daño crecientes del ADN de una célula detectados a través del ensayo cometa (de arriba hacia abajo). En la fotografía inferior se aprecia una apoptosis

La Sociedad de Mutagénesis Ambiental Japonesa (de sus siglas en inglés, JEMS), generó una iniciativa cuyo objetivo es coordinar ensayos de validación del ensayo cometa, para establecer la guía a ser incluida en la Organización para la

Cooperación Económica y el Desarrollo (de sus siglas en inglés OECD)¹, *in vivo* e *in vitro* para este ensayo. En dicha guía, se estandariza la selección e identificación de los cometas “aptos” para el análisis de imágenes. Aquellos cometas que presentan anomalías morfológicas, con núcleos atípicos, difundidos o identificados como “hedgehogs” (erizos) deben ser descartados (JaCVAM, 2010).

Existen numerosos estudios que muestran la fiabilidad de los resultados obtenidos mediante el ensayo de electroforesis en células individuales (ensayo cometa), en cuanto a que el daño medido a través de las variables que generan los programas específicos (Comet ImageTM, Comet ScoreTM, Comet Assay IVTM, etc.) como Tail Moment Olive o porcentaje de ADN de la cola del cometa, se debe a daño inducido por mutágenos y no por eventos de apoptosis o necrosis (Rundell y cols, 2003).

Un panel de científicos especializados, durante el Workshop sobre Procedimientos para Ensayos de Genotoxicidad (Marzo, 1999), llegaron al consenso de que la versión óptima para identificar actividad genotóxica es la versión alcalina del cometa (pH>13) desarrollado por Singh y cols. (1998). A través del ensayo cometa alcalino, es posible detectar rupturas simple hebra (single strand breaks SSB), rupturas doble hebra (double strand breaks DSB), sitios álcali lábiles (alkali-labile sites ALS), ligamientos cruzados DNA-DNA/DNA-proteínas (DNA-DNA/DNA-cross linking) y sitios de reparación por escisión de nucleótidos (excision repair, ER). Si es de interés del investigador, existen enzimas, anticuerpos o condiciones de acidez/alcalinidad, que se pueden utilizar para distinguir entre las diferentes clases de daño. En relación a otros ensayos de genotoxicidad, las ventajas del ensayo cometa es su demostrada sensibilidad para detectar bajos niveles de daño genético. Un paso importante a tener en cuenta al desarrollar este ensayo, es el uso del test de difusión neutra (Singh, 2000) para identificar células necróticas/apoptóticas.

Test de micronúcleos

Los micronúcleos (MN) son pequeños corpúsculos compuestos por material genético. Luego de la separación de las cromátidas en el proceso mitótico, dos

¹

Esta organización surge en 1960, cuando 18 países europeos, sumados a Estados Unidos y Canadá, unieron fuerzas para crear una organización dedicada al desarrollo global. Actualmente, hay 34 países miembro en todos los continentes, incluyendo países desarrollados y en vías de desarrollo como México, Chile y Turquía y economías en crecimiento como Brasil, China e India. Han solicitado unirse nuevos países, en Latinoamérica y el Caribe.

núcleos son reconstituidos, uno en cada polo. La membrana nuclear se forma alrededor de estos dos conjuntos de cromosomas, pero si un cromosoma entero o un fragmento cromosómico acéntrico no se integra a alguno de los nuevos núcleos (al no estar unido al huso), formará un pequeño núcleo individual llamado micronúcleo (Figura 4) (Garriott y cols, 2002; Zalacain y cols, 2005).

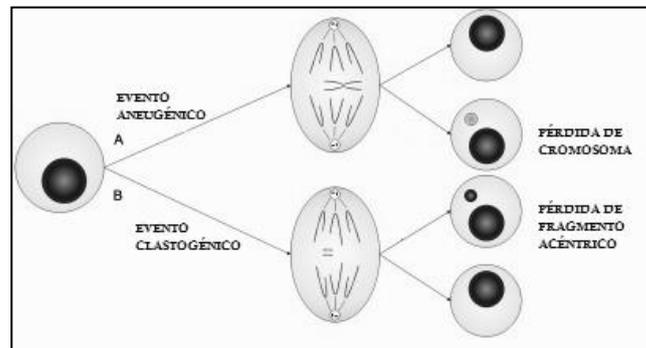


Figura 4. Proceso de formación de un MN.

Este ensayo fue usado por primera vez en médula ósea de ratón por Schmid y cols. (1971). A partir de la década del '80, el modelo del ensayo en médula ósea fue el más utilizado para monitorear la potencialidad genotóxica de diferentes químicos y en 1983, aparecen las primeras guías de trabajo para este ensayo (OECD, 1983). En esta década además, se difundieron monitoreos de trabajadores expuestos a mezclas complejas de solventes orgánicos de la industria de las pinturas, demostrando las propiedades mutagénicas de dichas sustancias que se expresaban como MN, dañando el aparato mitótico o induciendo rupturas cromosómicas detectables en linfocitos y mucosa oral (Stich y cols, 1985). En el año 1997, se divulgaron las guías para la evaluación de químicos mediante el ensayo de MN en eritrocitos de sangre periférica y en médula ósea de mamíferos (OECD, 1997), que un año más tarde la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) publicaría como OPPTS 870.5395 en el caso de los eritrocitos de mamíferos, estableciendo detalladamente su aplicabilidad (EPA, 1998).

En definitiva, los MN son estructuralmente pequeños núcleos delimitados por membrana, que representan material genético perdido por el núcleo principal, como consecuencia del daño genético causado por agentes físicos, químicos o biológicos, que interfieren con el proceso de unión de los cromosomas a las fibras de huso o que pueden inducir eventos aneugénicos (pérdida de un cromosoma) o

clastogénicos (pérdida de un fragmento cromosómico) (Zalacain y cols, 2005). Cabe destacar, que los MN se forman durante la mitosis, independientemente del tipo de daño ocurrido durante el ciclo celular. Debido a ello, los daños causados por agentes mutagénicos sobre la molécula de ADN, darán lugar a MN después de un ciclo de división celular (Ribeiro y cols, 2003; Resgalla y cols, 2008).

En la actualidad, el test de micronúcleos *in vivo*, está aceptado por las agencias internacionales y las instituciones gubernamentales como parte de la batería de test recomendados en evaluaciones de toxicidad en general y particularmente de genotoxicidad (Ribeiro y cols, 2003; Resgalla y cols, 2008).

Allium test

En las plantas superiores los meristemas proliferan siguiendo una cinética en equilibrio dinámico, lo que puede evaluarse a través de una serie de indicadores tales como velocidad de crecimiento, población de células en división celular, duración del ciclo celular, índice mitótico (proporción de células en división en relación a las células en interfase) y frecuencia de células en los diferentes estados morfológicos. Los meristemas de Liliáceas, como *Allium*, son frecuentemente utilizados para estudios de la dinámica celular porque constituyen un sistema *in vitro* ideal para analizar los efectos de mezclas complejas de contaminantes, así como para estudiar los mecanismos regulatorios que afecten el ciclo celular. Actualmente dichos estudios se conocen como “*Allium* test” que se utiliza para determinar los efectos de diferentes xenobióticos o principios activos obtenidos de plantas y animales (Cano y cols, 2002). Dada su alta sensibilidad, los bioensayos en plantas demostraron ser muy apropiados para evaluar la ausencia de riesgo de ciertos compuestos químicos, debido a la concordancia constatada entre los ensayos de plantas y mamíferos *in situ* e *in vitro* (Ennever y cols, 1988). En 1980, la EPA incluyó el ensayo de aberraciones cromosómicas en meristemas de raíz de *Allium cepa*, para monitorear polutos en el ambiente. Este ensayo ha demostrado ser altamente sensible en la detección de mutágenos, clastógenos y carcinógenos en diferentes compartimentos ambientales, ha sido validado y su protocolo está estandarizado (Mudry y Greizerstein, 2006). El test de *Allium* es aplicable a muestras de agua proveniente de cuerpos naturales; agua para beber; efluentes domésticos e industriales; compuestos solubles y sedimentos (Castillo, 2004; Mudry y Greizerstein, 2006).

Cuando un bulbo de *Allium* se rehidrata, se produce una estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces de la planta. Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemas radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis, alterándolo (lo que da lugar a aberraciones cromosómicas) o destruyendo las células. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz y por tanto su elongación. El efecto puede determinarse en forma indirecta, mediante la comparación del índice mitótico y presencia de aberraciones en células provenientes de raíces expuestas con las de raíces no expuestas (Castillo, 2004).

Las proteínas responsables por la regulación del ciclo celular y la mitosis (Figura 5), están bajo estricto control de sistemas que bloquean o reinician la maquinaria que lleva a cabo dicho ciclo, en el orden correcto, respondiendo a información intra y extra celular que asegura su adecuado desarrollo (Figura 6). Cuando esos sistemas de control reciben una señal de inhibición, el ciclo es bloqueado por una serie de elementos llamados reguladores negativos o checkpoints. Existen tres importantes checkpoints durante el ciclo celular: el primero en la fase G1/S, donde la entrada a la replicación puede bloquearse debido a condiciones desfavorables o crecimiento celular inapropiado. El segundo, en la entrada de la mitosis (G2/M), donde el ciclo se bloquea si la replicación del ADN no se ha completado o la molécula de ADN está dañada. Finalmente, el tercer checkpoint (M/G1) se activa durante el cambio de metafase a anafase cuando los cromosomas no se han unido a los microtúbulos del huso mitótico o el mismo no se ha formado correctamente. La regulación del ciclo celular, depende del balance de estímulos positivos y de estímulos negativos en los tres checkpoints. Esto implica que las células pueden reconocer la incidencia del daño en la molécula de ADN (del Campo y cols, 2005).

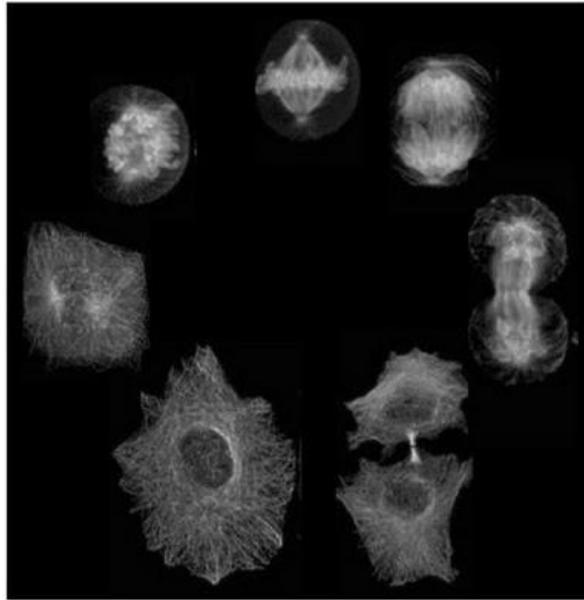


Figura 5. Imágenes del proceso mitótico²

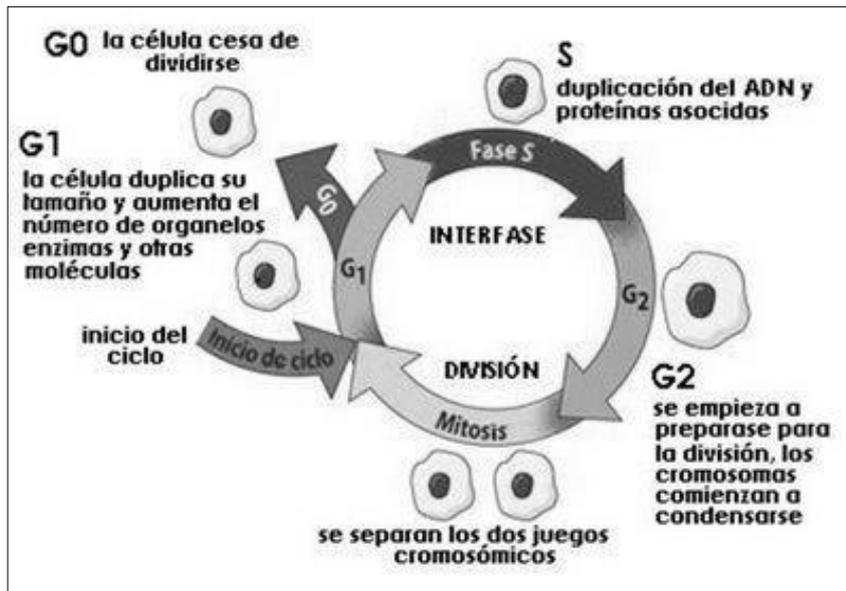


Figura 6. Fases del ciclo celular³

² Extraído de <http://www.academicosenlineanetmoodle-itzel.blogspot.com/2010/11/fases-del-ciclo-celular.html>

³ Extraído de <http://www.noticiascientificas.info/2011/02/que-es-el-ciclo-celular.html>

BIBLIOGRAFÍA

- Altuna, C.; Francescoli, G.; Tassino, B. y Izquierdo, I. (1999). Ecoetología y conservación de mamíferos subterráneos de distribución restringida: El caso de *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Octodontidae) en el Uruguay. *Etología*. 7: 47-54.
- Anderson, D.; Yu, T.-W.; Phillips, B. y Schmezer, P. (1994). The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. *Mutat Res.* 307:261–271.
- Arocena, R. (1998). Statistical analysis of benthic communities to assess suspected degradation and recuperation zones in an urban stream (Uruguay). *Verh. Int. Verein. Limnol.* 26: 1188–1192.
- Arocena, R.; Fabián, D. y Clemente, J. (2000). Natural causes versus organic pollution as structuring factors of zoobenthos in three tributaries of a coastal lagoon. *Limnética* 18, 99–113.
- Arocena, R. (1996). The benthic community as an indicator of degradation and recovery areas in Toledo stream (Uruguay). *Rev. Biol. Trop.* 44 (2): 659–671.
- Bennett, E.; Reed-Andersen, T.; Houser, J.; Gabriel, J. y Carpenter, S. (1999). A phosphorus budget for the Lake Mendota Watershed. *Ecosystems*. 2: 69-75.
- Bidau, C.; Giménez, M. y Contreras, J. (1996). Especiación cromosómica y la conservación de la variabilidad genética: El caso del género *Ctenomys* (Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae). *Mendeliana*. 12 (1):25-37.
- Binning, C.; Cork, S.; Parry, R. y Shelton, D. (2001). *Natural Assets: An Inventory of Ecosystem Goods and Services in the Goulburn Broken Catchment*. CSIRO Sustainable Ecosystems, Canberra.
- Bocker, W.; Bauch, T.; Muller, W. y Streffer, C. (1997). Image analysis of Comet assay measurements. *Int. J. Radiat. Biol.* 72: 449–460.
- Buchwalter, D.; Jenkins, J. y Curtis, L. (2003). Temperature influences on water permeability and chlorpyrifos uptake in aquatic insects with differing respiratory strategies. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2806-2812.
- Butterworth, F. (1995). Introduction to biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change. Pp. 1-8. In: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Ed. Butterworth, B.; Corkum, L.; Guzmán-Rincón, J. Plenum Press, New York.
- Cano, M.; Peña, J. y Gonzales-Figueroa, H. (2002). Alteraciones de los índices de fases y mitótico en meristemos de *Allium cepa*, inducidas por extractos de *Lepidium meyenii walp* “Maca”. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Ricardo Palma*. 3 (1): 21-22.
- Casarett, L. y Doull's J. (2001). *Toxicology: The basic science of Poisons*. Ed. Klaassen, C.; Amdus, M. y Dowl, J. Macmillan Publishing Company.
- Castillo, G. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IDRC, Canadá. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México. Pp. 189.
- Chalar, G. (1994). Composition and abundance of zoobenthos in Toledo stream (Uruguay) and its relation with water quality. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 67: 129–141.
- Chalar, G. (2006). Eutrophication dynamics on different temporary scales: Salto Grande Reservoir (Argentina–Uruguay). En: Tundisi, J.G.; Matsumura-Tundisi, T. y Sidagis, C. (eds.).

- Eutrophication in South America: Causes, Consequences and Technologies for Management and Control. International Institute of Ecology, Inc. São Carlos, SP. Pp. 87–101.
- Chalar, G. (2009). The use of phytoplankton patterns of diversity for algae bloom management. *Limnologica* 39: 200–208.
- Chalar, G.; Arocena, R.; Pacheco, J. y Fabián, D. (2011). Trophic assessment of streams in Uruguay: A Trophic State Index for Benthic Invertebrates (TSI-BI). *Ecological Indicators*. 11: 362–369.
- Cicerone, D.; Sánchez-Proañó, P. y Reich, S. (2007). Contaminación y medioambiente. Ed. Eudeba. ISBN 978-950-23-1489-1. Argentina. Pp. 203.
- CMA-JA (CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE DE LA JUNTA DE ANDALUCÍA). (1999). “Los criterios y estándares para declarar un suelo contaminado en Andalucía y la metodología y técnicas de toma de muestra y análisis para su investigación”. España. Pp. 257.
- Collins, A.; Azqueta, A.; Brunborg, G.; Gaivao, I.; Giovannelli, L.; Kruszewski, M.; Smith, C. y Stetina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Review. Mutagenesis*. 23(3):143–151.
- Conde, D.; Gorga, J.; Paradiso, M.; De León, L. y Brugnoli, E. (2002). Water quality problems in the large reservoir system of Río Negro (Uruguay). *Revista CIER (Comisión de Integración Energética Regional)* 39: 51–67.
- da Silva, J.; Erdtmann, B. y Henriques, J. (2003). *Genética Toxicológica*. Ed. Alcance. Brasil. Pp. 422.
- Damiá Barceló, M. y López, M (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales. Barcelona. Pp. 24.
- De Azevedo, F. y Da Matta, A. (2004). *As bases toxicológicas da ecotoxicologia*. InterTox. ISBN 85-89843.01-7. Brasil. Pp. 322.
- De Boeck, M.; Touil, N.; De Visscher, G.; Vande, P. y Kirsch-Volders, M. (2000). Validation and implementation of an internal standard in Comet assay. *Mutat. Res.* 469: 181–197.
- De Groot, R.; Wilson, M. y Bowmans, A. (2002). A typology for the classification, description, and evaluation of ecosystem functions, goods and services. *En : Ecological Economics* No. 41: 393-408.
- Del Campo, A.; Bracho, M.; Marcano, L.; Guíñez, J. y De la Torre, C. (2005). DNA injury induced by 5-aminouracil and caffeine in G2 checkpoints path of higher plant cells. *Biocell*. 29(2): 169-176.
- DeLeón, L. y Chalar, G. (2003). Phytoplankton abundance and diversity at Salto Grande Reservoir (Uruguay–Argentina). Seasonal cycle and spatial distribution. *Limnética* 22: 103–113.
- DINAMA-JICA (La Agencia de Cooperación Internacional de Japón). La protección de los Recursos Hídricos en la Cuenca del Río Santa Lucía. ANEXO (8.4.4). www.dinama.gub.uy
- Ennever, F.; Andreano, G. y Rosenkranz, H. (1988). The ability of plant genotoxicity assays to predict carcinogenicity. *Mutat. Res.* 205: 99-105.
- Environmental Protection Agency, EPA 712-C-98-226, United States (1998). Health effects test guidelines OPPTS 870.5395. Mammalian erythrocyte micronucleus test.
- Esteves, L.; Toldo, J.; Dillenburg, S. y Tomazelli, L. (2002). Long- and short-term coastal erosion in Southern Brazil. *J. Coastal Res.* 36 (Special Issue): 273-282.

Fairbairn, D.; Walburger, D.; Fairbairn, J. y O'Neill, K. (1996). Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: Discriminating apoptosis from necrosis. *Scanning* .18:407–416.

FAO (Food and Agriculture Organization) (1997). Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos. <http://www.fao.org/docrep/W2598S/W2598S00.htm>. ISBN 92-5-303875-6

Farrington, J.; Davis, A.; Tripp, B.; Phelps, D.; Galloway, W. (1987). “Mussel watch” measurements of chemical pollutants in bivalves as one indicator of coastal environmental quality. Pag. 125-139. En: Boyle, T. (ed.). *New approaches to monitoring aquatic ecosystems*. American Society for Testing and Materials. Philadelphia.

Fernandes, F.; Fernández-Stolz, G.; Lopes, C. y Freitas, T. (2007). The conservation status of the tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae), in southern Brazil. *Braz. J. Biol., 67(4, Suppl.)*: 839-847.

Fernández-Stolz, G. (2007). Estudos evolutivos, filogeográficos e de conservação em uma espécie endêmica do ecossistema de dunas costeiras do sul do Brasil, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia - Ctenomyidae), através de marcadores moleculares microssatélites e DNA mitocondrial. Pp. 179 (Tese de Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

FPTCDW: Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water. (2011). Total Coliforms in Drinking Water. Canadá. Pp. 34.

Frankham, R.; Montgormery, M.; England, P.; Lowe, E. y Briscoe, D.(1999). Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential? *Anim. Conserv.* 2(4): 255-260.

Gallardo, M. (1995). Genética y demografía en *Ctenomys* (Rodentia; Ctenomyidae) en hábitats fragmentados. *Marmosiana*. 1: 34-42.

Garriott ML, Phelps JB, Hoffman WP. (2002). A protocol for the in vitro micronucleus test. I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutat Res.* 2 (517): 123-134.

Gessner, M. y Chauvet, E. (2002). A case for using litter breakdown to assess functional stream integrity. *Ecol. Appl.* 12: 498-510.

Gutiérrez, S. (2000). Eutrofización en Embalses, en *Ambiente Ecológico*, <http://www.ambiente-ecologico.com/ediciones/072-07-2000/072-silvinagutierrez.html>

Heuser, V.; da Silva, J.; Moriske, H.; Dias, J.; Yoneama, M. y Freitas, T. (2002). Genotoxicity Biomonitoring in Regions Exposed to Vehicle Emissions Using the Comet Assay and the Micronucleus Test in Native Rodent *Ctenomys minutus*. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 40:227–235.

Hosper, H. (1997). Clearing lakes: an ecosystem approach to the restoration of management of shallow lakes in the Netherlands. Ministry of Transport, Public Works and Water Management. Institute of Inland Water Management and Waste Water Treatment (RIZA). Lelystad.

Iida, C. y Shock, C. (2009). El dilema del fósforo. *Técnicas para la agricultura sostenible*. Oregon State University. EM 3989-S-E. Pp. 1-5.

INE (Instituto Nacional de Ecología). (2006). *La investigación ambiental para la toma de decisiones*. ISBN 918-817-818-7. México. Pp. 320.

Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) (2010). *In Vivo Comet Assay: Update on Ongoing International Validation Study Coordinated by JaCVAM (2nd Report)*.

- Jørgensen, S.; Constanza, R., FuLiu, X. (2005). Handbook of ecological indicators for assessment of ecosystem health. Taylor & Francis.
- Kandus, P.; Morandeira, N. y Schivo, F. (2010). Bienes y Servicios Ecosistémicos de los Humedales del Delta del Paraná. Fundación para la Conservación y el Uso Sustentable de los Humedales Representante de Wetlands International. ISBN 978-987-24710-2-6. Argentina. Pp. 32.
- Karr, J. (1996). Ecological integrity and ecological health are not the same. Engineering within ecological constraints (Schulze, P (ed.)). National Academy Press, Washington DC. Pp. 97-109.
- Kay, J. and Schneider, E. (1991). Thermodynamics and measurements of ecosystem integrity, in Ecological Indicators. (McKenzie, D. (ed.)) Elsevier, Amsterdam. Pp. 159–182.
- Keys, P.; Barron, J y Lannerstad, M. (2012) Releasing the Pressure: Water Resource Efficiencies and Gains for Ecosystem Services. Nairobi: United Nations Environment Programme; Stockholm: Stockholm Environment Institute. ISBN: 978-92-807-3340-5. Pp. 64.
- Lampert, W. y Sommer, U. (1997). Limnoecology: The ecology of lakes and streams. Oxford University Press. New York.
- Lande, R. (1995). Breeding plans for small populations based on the dynamics of quantitative genetic variance. In Ballou, J.; Gilpin, M. y Foose, T. (eds.). Population Management for Survival and Recovery. New York, Columbia University Press, Pp. 318-340.
- Márquez, A.; Senior, W.; Martínez, G. y González, A. (2007). Concentraciones de nitrógeno y fósforo en sedimentos recientes de la Laguna Los Patos, Estado Sucre, Venezuela. Bol. Inst. Oceanogr. 46 (2): 137-145.
- Mazzeo, N.; Clemente, J.; García-Rodríguez, F.; Gorga, J.; Kruk, C.; Larrea, D.; Meerhoff, M.; Quintans, F.; Rodríguez-Gallego, L. y Scasso, F. (2002). Eutrofización: Causas, consecuencias y manejo. En: PERFIL AMBIENTAL DEL URUGUAY. Ed. Noran. Pp. 201.
- McKelvey-Martin, V.; Green, M.; Schmezer P.; Pool-Zobel, B.; De Meo, M. y Collins A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. Mutat Res. 288:47–63.
- Miller, F.; Vandome, A. y McBrwster, J. (2010). Comet assay. Ed. Alphascript Publishing . Pp. 173.
- Mitsch W. y Gosselink J. (1986). Wetlands. Reinhold, NY.
- Morlans, A. (2010). Contaminación difusa en acuíferos: Estudio de caso en la comuna de Colina, Región Metropolitana. Tesis Ing. Civ. Chile. Pp. 93.
- Mudry, M. y Carballo, M. (2006). Genética Toxicológica. Ed. De los Cuatro Vientos. Argentina. Pp. 669.
- Mudry, M. y Greizerstein, E. (2006). Principios de citogenética y evaluación genotóxica. Pág. 57-81. En: Genética Toxicológica. Ed. Mudry, M. y Carballo, M. De los Cuatro Vientos. Argentina. Pp. 669
- Newman, M. y Clements, W. (2008). Ecotoxicology: a comprehensive treatment. CRC Press. Pp. 852.
- Newman, M. y Unger, M. (2003). Fundamentals of Ecotoxicology. CRC Press/Lewos Publishers, Boca Raton, FL.
- Niyogi, D.; Simon, K. y Townsend, C. (2003). Breakdown of tussock grass in streams along gradient of agricultural development in New Zeland. Freshw. Biol. 48: 1698-1708.
- OECD (1997). Mammalian erythrocyte micronucleus test. Guidelines for testing of chemicals, 474.

- OECD. (1983). Genetic Toxicology: Micronucleus test. Guidelines for testing of chemicals.
- Oliva, R.; Ballesta, F.; Oriola, J. y Claria, J. (2008). Genética médica. Días de Santos eds. ISBN 9788447533176. España. Pp. 443.
- Olivia, B. y Pérez, J. (2005) La contaminación del agua y su impacto en la salud en Guatemala. <http://www.ncenterprise.com>
- Olive, P.; Wlodek, D.; Durand, R. y Banath, J. (1992). Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp. Cell. Res.* 198: 259–267.
- OMS (Organización Mundial para la Salud). (2000). La salud y el ambiente en el desarrollo sostenible. Publication Científica No. 572. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Washington. ISBN 92 75 31572 8. Pp. 283.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (2004). Guías para la calidad del agua potable. Recomendaciones. Vol 1. Tercera ed. Ginebra. ISBN 92 4 154638 7. Pp. 101.
- Ostling O. y Johanson K. (1984). Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys Res Commun.* 123:291–298.
- Pacheco, A. (2008). Environmental Fate of Bioaccumulative and Persistent Substances - A Synopsis of Existing and Future Actions. *Rev. Gerenc. Polit. Salud.* 7 (15): 14-23. ISSN 1657-7027.
- Pérez, R. (2008). Contaminación agrícola y políticas públicas en México. XI Jornadas de Economía Crítica. UNAM. Pp. 23.
- Petras, M.; Vrzoc, M.; Pandrangi, R.; Ralph, S. y Perry, K. (1995). Biological monitoring of environmental genotoxicity in southwestern Ontario. Pp. 115-137. In: *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change.* Ed. Butterworth, B.; Corkum, L.; Guzmán-Rincón, J. Plenum Press, New York.
- Pinilla, G. (1998). Indicadores biológicos en ecosistemas acuáticos continentales de Colombia. Centro de Investigaciones Científicas. Universidad de Bogotá. Pp.66.
- Pintos, W., Conde, D. y Norbis, W. (1993). Organic pollution study of Uruguay River (Paysandú). *Rev. Cien. Nat. Lit.* 23 (1–2), 21–30.
- Prieto, E. y Papeschi, A. (2006). Mecanismos de reparación del ADN. Pág. 133-174. En *Genética Toxicológica.* Ed. Mudry, M y Carballo, M. De los Cuatro Vientos. Argentina. Pp. 669.
- Quiroga, R. (2007). Indicadores ambientales y de desarrollo sostenible: Avances y perspectivas para América Latina. CEPAL. ISSN 1680–886X, Chile. Pp. 227.
- RAPAL (2010). Contaminación y eutrofización del agua. ISBN 978-9974-8029-7-1. Uruguay. Pp. 30.
- Red Ara. (2011). Aportes para un diagnóstico de la problemática ambiental de Venezuela. Pp. 57 <http://red-ara-venezuela.blogspot.com>
- Ribeiro, L.; Salvadori, D. y Marques, E. (2003). *Mutagenese Ambiental.* Ed. ULBRA. Brasil. Pp. 356.
- Rojas, E.; Lopez, M. y Valverde, M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromat B.* 722:225–254.
- Ronco, A.; Díaz, M. y Pica Y. (2004). Conceptos generales. Monitoreo ambiental. Pág. 17-30 En: *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad deguas.* Estandarización,

- Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. IDRC-IMTA Ed. Gabriela Castillo. Canadá. ISBN 968-5536-33-3 Pp. 189.
- Rundell, M.; Wagner, E. y Plewa, M. (2003). The comet assay: genotoxic damage or nuclear fragmentation? *Environ. Mol. Mutag.* 42 (2): 61-67.
- Scasso, F.; Mazzeo, N.; Gorga, J.; Kruk, C.; Lacerot, G.; Clemente, J.; Fabián, D. y Bonilla, S. (2001). Limnological changes in a sub-tropical shallow hypertrophic lake during its restoration: two years of a whole-lake experiment. *Aquat. Conserv.: Mar. Freshw. Ecosyst.* 11: 31–44.
- Schmitt, R. y Osenberg, C. (1996). *Detecting ecological impacts*. Academic Press Inc. ISBN 0-12-627255-7. United Kingdom. Pp. 401.
- Silva, J.; Freitas, T.; Heuser, V.; Marinho, J. y Erdtmann, B. (2000b). Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by comet assay and micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (4): 270-278.
- Silva, J.; Freitas, T.; Heuser, V.; Marinho, J.; Bittencourt, F.; Cerski, C.; Klassmann, L. y Erdtmann, B. (2000a). Chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated with multiple methods and tissues. *Mutat. Res.* 470 (1): 39-51.
- Silva, J.; Ramírez, L.; Alfieri, A.; Rivas, G. y Sánchez, M. (2004). Determinación de microorganismos indicadores de calidad sanitaria. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 24(1-2): 46-49. ISSN 1315-2556
- Singh, N. (2000). Simple Method for Accurate Estimation of Apoptotic Cells. *Experimental Cell Research* 256, 328–337. doi:10.1006/excr.2000.4810, available online at <http://www.idealibrary.com>
- Singh, N.; McCoy, M.; Tice, R. y Schneider, E. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175:184–191.
- SNAP (Sistema Nacional de Áreas Protegidas, DINAMA) (2006). *Guía de Educación Ambiental. Humedales del Santa Lucía*.
- Speit, G. y Hartmann, A. (1999). The comet assay (single-cell gel test): a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *DNA Repair Protocols.* 113:203–212.
- Spiro, T. y Stigliani, W. (2004). *Química medioambiental*. Ed. Pearson. 2ª ed. Pp. 520.
- Stich, H.; Stich, W. y Rosin, M. (1985). The micronucleus test on exfoliated human cells. *Basic Life Sci.* 34: 337-342.
- Tapanainen, M.; Jalava, P.; Mäki-Paakkanen, J.; Hakulinen, P.; Happonen, M.; Lamberg, H.; Ruusunen, J.; Tissari, J.; Nuutinen, K.; Yli-Pirilä, P.; Hillamo, R.; Salonen, R.; Jokiniemi, J. y Hirvonen, M. (2011). In vitro immunotoxic and genotoxic activities of particles emitted from two different small-scale wood combustion appliances. *Atmospheric Environment* 45:7546-7554.
- Tice, R. (1995). The single cell gel/comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips DH, Venitt S, editors. *Environmental mutagenesis*. Oxford: Bios Scientific Publishers. Pp 315–339.
- Tice, R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J. y Sasaki, Y. (2000). Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 35:206–221.

Tomazelli, L. y Villwock, J. (2000). O Cenozóico no Rio Grande do Sul: Geologia da Planície Costeira. En HOLZ y DE ROS, LF. (eds.) Geologia do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, CIGO/ UFRGS, Pp. 375-406.

UNEP-ICPEMC. (International Comission for Protection Against Environment Mutagens and Carcinogens) (1992). Assessing the risk of genetic damage. Ed. Brusick, D.; Gopalan H.; Heseltine, E.; Huisman, J. y Lohman, P.

Urdiales, C. (2006). Propuesta de delimitación y zonificación de futuras áreas protegidas en el río Santa Lucía y Esteros de Farrapos e islas del Río Uruguay.

Valdez C. y Ruiz Luna, A. (2012). Conceptual framework and classification of ecosystem services. BioCiencias. 1(4): 3 a 15.

Vilchez, H. (2010). Manual de Prácticas de Microbiología. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica. Perú. Pp. 101.

Wenner, A. (1988). Crustaceans and other invertebrates as indicators of veach pollution. Pag. 199-229. En: Soule, D. y Kleppel, G. (eds). Marine organisms as indicators. Pringer. New York.

Zalacain, M.; Sierrasesúmaga, L. y Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. Anales cfnavarra. Revisión. Vol. 28. <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol28/n2/revis2a.html>

HIPÓTESIS

1. El mayor humedal del área ecológica Playa Penino se encuentra impactado por la llegada de efluentes cloacales.
2. Los biomarcadores de daño genético constituyen herramientas que reflejan el impacto de estos contaminantes sobre organismos centinelas pertenecientes al género *Ctenomys* de Playa Penino.
3. Los individuos de *Ctenomys* colectados en la zona sur de Carrasco, donde existe sistema de saneamiento, presentan niveles de daño genético inferiores a los de Playa Penino.
4. Las poblaciones de *Ctenomys pearsoni* de la costa uruguaya utilizados como centinelas ambientales, constituyen buenos bioindicadores.
5. Los linfocitos provenientes de las poblaciones de *Ctenomys pearsoni* utilizadas para este trabajo, se comportan *in vitro* de forma similar frente al daño genético, dado que la maquinaria de reparación celular está evolutivamente conservada, en especial a nivel específico.

OBJETIVOS

- ✓ Efectuar la caracterización ambiental del mayor humedal de Playa Ecológica Penino, a través de la utilización de parámetros físico-químicos, microbiológicos y biomarcadores de daño genético, así como la relación entre ellos.
- ✓ Investigar la respuesta *in situ*, de organismos elegidos como centinelas (*Ctenomys pearsoni*) frente a la acción de agentes genotóxicos utilizando los biomarcadores de daño genético; ensayo cometa y test de micronúcleos.
- ✓ Comparar los resultados con la respuesta de células eucariotas *in vitro* a través el test de *Allium* (validado por la EPA), expuestas a muestras provenientes de Playa Penino, sobre las que se analizaron parámetros físico-químicos y microbiológicos.
- ✓ Analizar si las respuestas de *Ctenomys* obtenidas a través de los biomarcadores genéticos de daño, no se deben a características intrínsecas y diferenciales de las poblaciones de *Ctenomys* utilizadas, a través de la exposición de linfocitos de dichas poblaciones a mutágenos *in vitro* y el análisis de reparación del daño.

SECCIÓN IA: Caracterización del mayor humedal de Playa Penino

Estado actual

La conservación y gestión de los recursos naturales en la cuenca baja del Río Santa Lucía se remonta a 1921, cuando las islas fiscales del curso inferior del río fueron declaradas áreas protegidas, mediante decreto del Poder Ejecutivo (N° 269/967). En el año 1985, a través de la Ley N° 15.793 se creó una Comisión Honoraria para el Estudio del aprovechamiento integral de la cuenca del Río Santa Lucía, integrada por representantes de distintos Ministerios y la Universidad de la República. Posteriormente, en 1996, la Intendencia Municipal de San José declaró a Playa Penino, a través de la resolución N° 774/996, como Playa Ecológica con el objetivo de promover su preservación (Aldabe y colaboradores, 2009). Otro antecedente a destacar, es el “Programa de conservación y gestión de los Humedales del Santa Lucía”, propuesto por las Intendencias de Canelones, San José y Montevideo en 2002, cuyo fin es la compatibilización de objetivos conservacionistas, uso y protección de recursos hídricos y promoción de actividades de recreación. En 2009, el Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente y las Intendencias departamentales de Canelones, Montevideo y San José; en el marco del acuerdo firmado por las instituciones mencionadas el 22 de marzo de 2006, constituyeron un grupo de trabajo coordinado por el Programa Agenda Metropolitana, para elaborar una propuesta de proyecto y delimitación del área “Humedales del Santa Lucía” para su ingreso al Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP).

Playa Penino, está ubicada en el Departamento de San José (34°47'S 56°24'W), en la actual Ciudad del Plata, se extiende 7 km a lo largo de la costa y concentra entre 244 y 150 especies de aves (20% son migratorias, llegando en diferentes épocas del año). El impacto de la urbanización inadecuada y de la contaminación, han sido mencionados por varios investigadores (Rocha, 1999; Aldabe y cols, 2009).

A fines de los '80 Arballo y colaboradores (1996), registraron 200 especies de aves. Entre 1996 y 1997, Rocha (1999) a través de relevamientos exhaustivos constató no más de 149 especies. Como problemas ambientales de la zona, se describen; la quema de bañados, la sobrepoblación y la extracción de arena entre

otros (Rocha, 1999). Muchas especies de aves, no se registran desde el año 1997 como el águila pescadora *Pandion haliaetus* y el cardenal común *Paroaria coronata* (Figura 1a). Subsisten varias especies de chorlos que llegan en ciertas épocas del año, cisnes y algunas especies residentes como la pajonalera de pico recto *Limnoctites rectirostris* (Figura 1b).y la pajonalera de pico curvo *Limnornis curvirostris* (Rocha, 1999).



Figura 1- Aves de importancia para el SNAP registradas en Playa Penino.

© <http://www.juanjculasso.ronjaleader.net>

© <http://ibc.lynxeds.com/photo/straight-billed-reedhaunter-limnoctites-rectirostris/bird-reedbed>

Otros animales registrados en la zona de prioridad para el SNAP (Sistema Nacional de Áreas Protegidas) son la marmosa (*Cryptonanus sp*), la culebra marrón (*Clelia rustica*), la comadreja colorada chica (*Monodelphis dimidiata*) y varias especies de mamíferos entre los que se encuentran el apereá (*Cavia aperea*), el tucu tucu (*Ctenomys pearsoni*) y zorro de campo (*Pseudalopex gymnocercus*).

En Playa Penino, se ubica un humedal de agua dulce de gran extensión entre la ruta 1 y el Río de la Plata (Figura 2), ubicado dentro de la zona 1 (zonificación propuesta para la inclusión de los Humedales del Santa Lucía en el SNAP). Esta zona es de gran valor para aves, especialmente acuáticas y migratorias, por lo que se han sugerido medidas para evitar la destrucción de pajonales y control de la caza. Por otra parte, se busca implementar una estrategia de urbanización acorde a los objetivos de conservación de los ambientes naturales, que incluyen la instalación de senderos y cartelería para promover el turismo de observación de aves (Aldabe y cols, 2009). Se ha planteado monitorear la calidad de las aguas, controlar la extracción de arena, controlar la caza furtiva, el uso de agroquímicos,

controlar las especies invasoras vegetales y animales, entre otras acciones (Aldabe y cols, 2009).

Sin embargo, aunque muchos pobladores locales utilizan recursos naturales para su sustento, como la extracción de junco, totora, conchilla, arena y pesca artesanal, no hay en la actualidad ningún control efectivo sobre dichas actividades (Arballo y Bresso, 2007).



Figura 2- Humedal de agua dulce de gran extensión entre la ruta 1 y el Río de la Plata. Playa Penino.

Por resolución municipal 774/996, la Intendencia Municipal de San José declaró parte de la zona antes descrita, como reserva natural y área protegida a nivel local bajo la categoría de “Playa Ecológica”, la cual ha sido una de las áreas elegidas por la Dirección de Medioambiente (DINAMA) para la implementación de Medidas de Adaptación al Cambio Climático en Áreas Costeras del Uruguay en el marco del Programa de Medidas Generales de Mitigación y Adaptación al Cambio Climático (UCC, 2004).

Actualmente, los límites propuestos para la Reserva Natural Playa Penino son: por el sur y suroeste, 8,5 km de franja intermareal y aguas costeras del último tramo de la desembocadura del Río Santa Lucía (incluyendo la Isla del Tigre) y el contiguo del Río de la Plata. Por el este, norte y noroeste, la Ruta 1 (nueva), desde el puente que comunica con Santiago Vazquez al km 31 (Arballo y Bresso, 2007). De acuerdo al análisis diagnóstico transfronterizo del Río de la Plata y su Frente

Marítimo de FREEPLATA (2005), Playa Penino se encuentra dentro de las áreas de alto valor ecológico.

En esta zona, la conexión al agua potable es costosa e irregular (existen conexiones privadas directas). La presencia de napas a poca profundidad de un subsuelo arenoso, están severamente afectadas por descargas de aguas servidas además de la ausencia de una red de saneamiento (ITU, Facultad de Arquitectura, 2001).

Debido a que el saneamiento no existe, los desechos de las cloacas van a los pozos negros en su mayoría filtrantes o directamente a cunetas, la barométrica se vacía en el vertedero municipal, que se encuentra a un kilómetro y medio de la entrada de Delta del Tigre. Sin embargo, los pobladores denuncian vaciamientos ilegales. La zona conserva aún atributos naturales de relevancia, siendo de igual forma una de las preocupaciones, la contaminación (Pellejero y cols, 2006). En este sentido se han identificado asentamientos, donde los casos más graves se ven en las cercanías del vertedero municipal y un incremento incipiente de los mismos en los bordes de los humedales caracterizado por construcciones bajas con un fuerte crecimiento de la vivienda precaria, no controlada, con techos de chapa y paredes de bloque. Una de las tantas preocupaciones de la zona es la falta de trabajo y la falta de servicios. Las industrias ubicadas sobre ruta 1 (ISUSA, Effice, Air Liquide, Paycueros – la cual ya no opera en dicha zona-) vuelcan sus residuos al Río de la Plata y corrientes de agua que desembocan en el río Santa Lucía (Pellejero y cols, 2006). Cabe destacar, que en dicha zona se encuentra parte del acuífero Raigón, de fundamental importancia para nuestro país, cuya profundidad es menor a los 40 metros y es única fuente de abastecimiento para más de 15.000 personas (incluyendo centros poblados, industrias y establecimientos rurales) (Martino y cols, 2008).

Son apreciables algunas modificaciones sobre la costa en un retroceso de los cordones arenosos del litoral, seguramente provocado por el avance de las áreas dedicadas a la extracción de arena en las proximidades de Playa Penino junto al avance de las construcciones y del trazado de la nueva Ruta 1 (ITU, Facultad de Arquitectura, 2001). En el informe GeoUruguay (Martino y cols, 2008), se cita a Playa Penino como un sitio cuya problemática principal es la erosión y la extracción irregular de arena para la construcción, así como la pérdida de biodiversidad por la urbanización desordenada y la contaminación ambiental.

La cobertura de saneamiento colectivo todavía presenta un retraso significativo en varias localidades de la cuenca del Río Santa Lucía, con un porcentaje importante de población no conectada a la red pública, y en algunas localidades con carencias en el nivel de tratamiento de los efluentes recolectados (San José, Canelones). Los sistemas individuales están constituidos en su mayoría por pozos negros, muchos de ellos permeables a las napas, y con desborde a las aceras o caños pluviales en muchos casos. Los lodos son retirados por camiones barométricos. Este sistema de saneamiento independiente, cuenta con puntos autorizados para el vertimiento de los líquidos, como las plantas de tratamiento de OSE, las plantas municipales exclusivamente para barométricas, y los terrenos particulares. No todos estos puntos autorizados son utilizados regularmente (DINAMA-JICA ANEXO 8.4.4).

METODOLOGÍA

Área de estudio

La zona de estudio se ubica en el humedal más extenso del área ecológica Playa Penino, ubicado al sur de la ruta 1, a la altura del kilómetro 30 (Figura 3). De dicho humedal nace una cañada poco profunda. Los animales centinela se concentran en las zonas marcadas como círculos blancos en la figura. La cantidad de círculos no representa el número de individuos capturados.

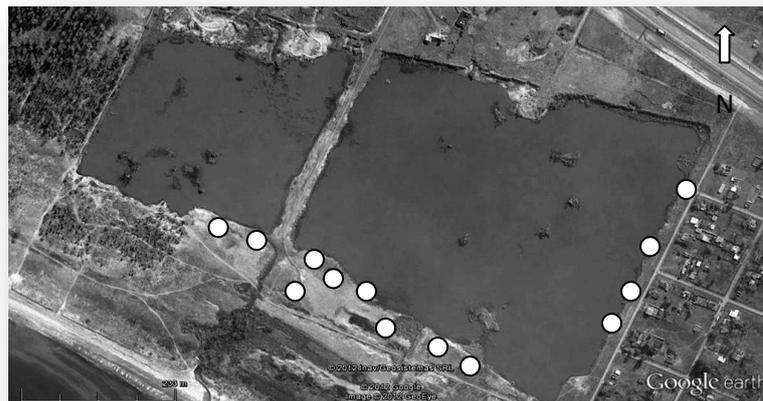


Figura 3. Las áreas en rojo indican las zonas de captura.
(Imagen modificada de Google Earth).

Obtención de muestras

Los animales fueron capturados usando trampas Victor Oneida N°0, se procedió a la extracción de sangre sin sedación a partir del corte de la uña de una falange posterior, de forma rápida. Para evitar el estrés se colocó cada animal en un tubo opaco dejando solo su zona posterior a la vista. Se seleccionaron individuos adultos los cuales fueron sexados. Posteriormente a la desinfección de la falange, los animales fueron devueltos a sus cuevas. Las muestras de sangre se colectaron por goteo y se colocaron en tubos conteniendo heparina (da Silva y cols, 2000). Se capturaron 30 individuos (15 hembras y 15 machos) en 4 momentos del año en los meses de febrero, mayo, agosto, octubre, para abarcar la mayor variabilidad estacional posible (es decir, meses lluviosos y secos).

Se mantuvieron individuos de *Ctenomys pearsoni* de Playa Penino en bioterio con temperatura controlada, dentro de peceras con arena y las especies *Cynodon dactylon* y *Paspalum nicorae*. Sobrevivieron 4 individuos (3 machos y 1 hembra) que fueron utilizados como control negativo.

Citotoxicidad

Las muestras fueron procesadas en el día. Las muestras de sangre se centrifugaron y se diluyeron en PBS. Posteriormente, se colocó medio volumen de Ficoll frío y se centrifugó nuevamente a temperatura ambiente. Luego se realizó la separación de linfocitos a través de Ficoll-histopaque (www.sigmaaldrich.com). Se recogieron los linfocitos y se diluyeron nuevamente en PBS, para el conteo en cámara Neubauer (Figura 4).

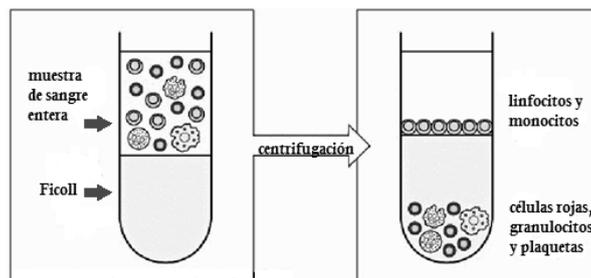


Figura 4. Procedimiento de separación de linfocitos en gradiente de Ficoll.

Previamente a la realización de los análisis se analizó citotoxicidad mediante la técnica de azul tripán y conteo en cámara de Neubauer (Figura 5). El azul tripán

es un colorante que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. De este modo, las células que aparecen en la imagen de color gris (en la realidad de color azul), son consideradas no viables (Martínez y cols, 2007).

Para el conteo se realizó una dilución 1:1 de suspensión celular en azul tripán. La cámara se cargó con 10 μL de la mezcla. Se utilizó microscopio óptico invertido para el conteo de células totales y viables. Las células viables, excluyen activamente el colorante y aparecen incoloras y “brillantes” (grises), ya que refractan la luz en contraste de fases (Figura 5).

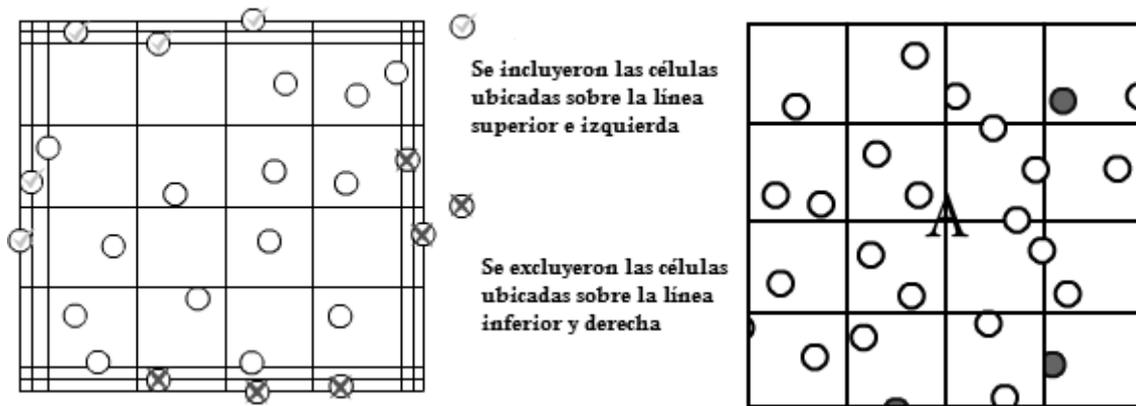


Figura 5. Procedimiento de análisis de viabilidad celular en cámara Neubauer.

Se contaron varios cuadrados y se calculó el promedio de células azules, blancas y totales. Cada cuadrado de la cámara representa un volumen de 0.1 mm^3 . Ya que 1 cm^3 equivale a 1 ml, se puede calcular el número total de células por ml. Aquellas muestras cuya viabilidad celular era inferior al 85 % se descartaron.

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \frac{\text{células totales viables (no teñidas)}}{\text{células totales (vivas y muertas)}}$$

Ensayo de electroforesis en células individuales (SCGE)

Para el ensayo cometa se siguió el protocolo descrito por Mudry y Carballo (2006):

- I. Preparación de las láminas de observación microscópicas con geles uniformes y estables (microgel). Las células sanguíneas de cada organismo centinela se resuspendieron en agarosa de bajo punto de fusión (LMP) y se colocaron sobre el microgel. El número óptimo de células por preparado y la concentración de agarosa se ajustaron en ensayos previos.
- II. Lisis de las células para liberar el ADN. Se colocaron los microgeles en solución de lisis (sales y detergentes) (pH=10), que posibilita la degradación de las membranas celulares y la extracción de proteínas. Para mantener la integridad de los geles se utilizó esta solución a 8° C.
- III. Desnaturalización de la doble hélice de ADN mediante la exposición a altas concentraciones de álcali (pH> 13). De esta manera se logran expresar todos los tipos de daño genético (sitios álcali lábiles, cross-links, rupturas simple y doble hebra).
- IV. Electroforesis⁴. El ADN desnaturalizado se sometió a un campo eléctrico en condiciones alcalinas para permitir el movimiento en el gel de las hebras o fragmentos rotos. Las condiciones de voltaje y amperaje se ajustaron de acuerdo a la cantidad de geles y el tamaño de la cuba utilizada en cada experimento.
- V. Neutralización de los álcalis mediante buffer a pH=7.5.
- VI. Tinción del ADN y visualización de los cometas. Luego de la neutralización, los preparados se colorearon con Bromuro de Etidio y se analizaron mediante software Comet ImagerTM que genera amplias bases de datos con más de 15 variables, de las cuales se utilizó; Tail Moment Olive (permite detectar daño genético de diferente origen) y porcentaje de ADN dañado (% ADN dañado), debido a su amplia utilización en la literatura científica así como su validación respecto a la óptima correlación con el daño genético.

⁴ Se corrieron geles con muestras de *Ctenomys* sometidas a tratamiento con metilmetanosulfonato (MMS) 4μM como control positivo y células de la línea CHO AA8 como control negativo para la electroforesis. Solo se utilizaron geles que se obtuvieron en electroforesis donde los controles positivos y negativos presentaron los resultados esperados (cometas para los controles positivos y células sin “cola” para los controles negativos).

- VII. El análisis de los preparados se realizó en un microscopio de epi-fluorescencia Zeiss con filtro de excitación de 505-560 nm con luz de mercurio de 100 w y filtro de barrido de 590 nm.
- VIII. No se contabilizaron las células apoptóticas (nubes de puntos) para los parámetros mencionados.
- IX. Análisis de los datos para el ensayo cometa. Se cuantificaron los datos del ensayo cometa para cada muestra utilizando software específico (Comet Imager™) en microscopio de epi-fluorescencia Zeiss. Los parámetros Tail Moment Olive y % de ADN dañado se analizaron a través de estadística paramétrica y no paramétrica (esta última para los casos en los que no se cumplían las condiciones de normalidad y homocedasticidad). Se utilizaron los programas Statistica 6.1, Statgraph Centurion XVI.I y BioEstat.

Test de micronúcleos

Siguiendo el procedimiento descrito por Fenech (2007), se realizaron los frotis para el conteo de eritrocitos policromáticos micronucleados (PCEs) y la frecuencia total de micronúcleos (MN). Se calcularon los porcentajes de PCEs y de micronúcleos a través del software Infinity Analyze™ en base al recuento de 2000 eritrocitos totales por frotis (los cuales se realizaron por duplicado y se promediaron los valores finales para cada individuo). Como indica la técnica, se consideran micronúcleos aquellos cuya dimensión se encuentra entre 1/16 a 1/3 de la dimensión del núcleo principal y que no se hallan unidos al mismo (Garriott y cols, 2002; Norppa y Falck, 2003; Zalacain y cols, 2005). Las frecuencias mencionadas se analizaron a través de estadística paramétrica y no paramétrica (esta última para los casos en los que no se cumplían las condiciones de normalidad y homocedasticidad). Se utilizaron los programas Statistica 6.1 y Statgraph Centurion XVI.I). Las observaciones se realizaron en microscopio de epi-fluorescencia Olympus acoplado a una cámara autoenfriada. **VER ANEXO**

Muestreo de agua, suelo y sedimento

En los meses de febrero, mayo, agosto y octubre se colectaron las muestras de suelo, sedimento y agua (en zonas cercanas a las orillas donde predomina la vegetación típica del humedal) luego de registrarse niveles medios de precipitación, con temperaturas para mayo cercanas a los 10°C y para agosto de 4°C. En los meses de febrero y octubre las precipitaciones fueron escasas y las temperaturas se hallaron en el entorno de 15°C para octubre y 24°C para febrero. Dichas muestras fueron utilizadas para *Allium* test (agua), para los ensayos físico-químicos (agua, sedimento y suelo) y microbiológicos (agua). Los sitios de colecta de suelo, sedimento y agua, se escogieron en zonas cercanas a las salidas de las cuevas donde los individuos fueron capturados. Se utilizaron 20 muestras de agua, 10 de sedimento y 10 de suelo para conformar cada muestra compuesta⁵ para cada mes (Figura 6).

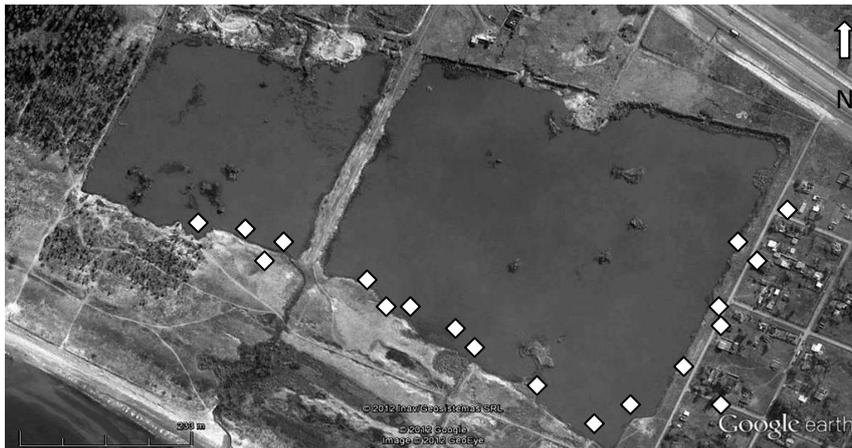


Figura 6. Sitios de colecta de muestras de suelo, sedimento y agua para conformar muestras compuestas. Los puntos no representan la cantidad de muestras tomadas

Allium test

Se colocaron 5 bulbos de *Allium cepa* con raíces de 2 cm por muestra de agua (muestras compuestas de agua correspondientes a los meses de captura de individuos en los meses de febrero, mayo, agosto y octubre).

Como control negativo, se utilizaron 5 bulbos en agua destilada. Luego de 48 horas de exposición a una temperatura que fluctó entre 18 y 20 °C, se procedió a la obtención de preparaciones citológicas. Se utilizaron los ápices radiculares que se

⁵ Son el resultado de una mezcla de muestras tomadas en varios puntos, representativos del ambiente heterogéneo.

fijaron en etanol-ácido acético (3:1) y se colorearon con orceína acetoclorhídrica (2%). Mediante la técnica del aplastamiento "squash", se obtuvieron láminas que fueron analizadas a través de un microscopio compuesto de campo claro. El índice mitótico se determinó sumando los diferentes estados morfológicos de la mitosis multiplicados por 100 y divididos entre el número total de células meristemáticas analizadas (Cano y cols, 2002; Mudry y Carballo, 2006). La frecuencia de células en división que presentan aberraciones se calculó dividiendo el número total de aberraciones analizados para cada tratamiento, entre 400 (Dragoeva y cols, 2009). La frecuencia de micronúcleos se obtuvo dividiendo el número total de células micronucleadas entre 2000 (número total de células analizadas para MN por tratamiento). Los análisis se realizaron en microscopio OLYMPUS de campo claro, acoplado a cámara autoenfriada y utilizando software Image Pro Plus™. Los índices mitóticos se compararon mediante test de Kruskal-Wallis (Zar, 2010).

Determinación de parámetros físico-químicos

Todas las muestras que se utilizaron son de tipo "compuesto". Para la obtención de sedimento y suelo se procedió de acuerdo a los pasos que se detallan:

- ✓ Se tomaron los primeros 2-20 centímetros de profundidad de sedimento y suelo de puntos previamente seleccionados, para constituir las muestras compuestas, con la ayuda de una espátula, extrayendo la fracción fina, evitando piedras y material grueso.
- ✓ Las muestras se mantuvieron en frascos estériles de plástico y se transportaron al laboratorio en contenedor con hielo.
- ✓ Se conservaron en el laboratorio a 4-5°C. En ningún caso se conservaron por un período mayor a 120 días sin ser analizadas.
- ✓ Las muestras de suelo y sedimento, fueron homogeneizadas y tamizadas para realizar las mediciones de nutrientes mediante métodos estandarizados (APHA AWWA WPCF, 1995) y adaptados a la matriz a través del servicio brindado por la *Sección Limnología* (Facultad de Ciencias).
- ✓ Las muestras de agua también compuestas, se transportaron en frascos estériles y en frío al laboratorio. Las mediciones de nutrientes se realizaron mediante métodos estandarizados (APHA AWWA WPCF, 1995) y adaptados a la matriz a través del servicio brindado por la *Sección Limnología* (Facultad de Ciencias).

- ✓ Se midió pH del agua en cada sitio de muestreo, con tiras de papel pH (método colorimétrico).

Análisis de aguas

Amonio

Método de azul de indofenol: Consiste en tratar la muestra con hipoclorito de sodio en medio alcalino tamponado con citrato, usando nitroprusiato de sodio como catalizador (Conde y cols, 1999). La absorbancia se mide a 630 nm y la concentración de amonio se calcula utilizando una curva de calibración. Rango del método es 1.4 a 350 µg/L (Conde y cols, 1999).

Nitrógeno total

Método de oxidación por persulfato de potasio: Para determinar el nitrógeno total en agua, los compuestos orgánicos deben ser hidrolizados y todas las formas transformadas en nitrato, como suceden en la oxidación por persulfato de potasio (Conde y cols, 1999). El procedimiento se realiza a altas temperaturas y en medio ácido para asegurar una oxidación total. Para los cálculos de concentración se utilizan curvas de calibración (con diluciones tratadas del mismo modo que las muestras).

Fósforo total

Método de Valderrama: La digestión a alta temperatura y medio ácido asegura la hidrólisis total de todas las formas de fósforo, permitiendo cuantificar el fósforo total. El método consiste en una digestión con ácido sulfúrico y persulfato de potasio a alta temperatura (Conde y cols, 1999), según modificación de APHA AWWA WPCF (1995). La concentración se calcula a partir de curva de calibración con estándares tratados del mismo modo que las muestras.

Nitrato

Método por salicilato de sodio: En presencia de silicato de sodio, el nitrato forma un compuesto de sustitución (p-nitrosalicilato) de color amarillo, cuya absorbancia se mide a 420 nm (Conde y cols, 1999). La concentración de la muestra se calcula usando una curva de calibración. Precisión: 0.1 mM N-NO₃/L (Conde y cols, 1999).

Fosfato

Fósforo reactivo soluble (Método de azul de molibdeno): El fósforo reactivo soluble (PRS) se define como la fracción de fósforo en la muestra filtrada que reacciona mediante el método de azul de molibdeno. Corresponde en forma aproximada al ortofosfato. El molibdato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio reaccionan en medio ácido con el ortofosfato, formando ácido fosfomolibdico, que es reducido a azul de molibdeno con ácido ascórbico (Conde y cols, 1999). Precisión 10 µg /L.

Análisis de suelos y sedimentos

La determinación del nitrógeno total en sedimento y suelo, se realizó a través del método de Valderrama (1981) para agua que ya fue descrito, adaptándolo para estas matrices. Para el fósforo total se utilizó el método basado en la combustión del sedimento (o suelo) y su digestión con ácido sulfúrico (Andersen, 1976). La relación nitrógeno total/fósforo total se obtuvo del cociente de la concentración de nitrógeno y fósforo total (Márquez y cols, 2007).

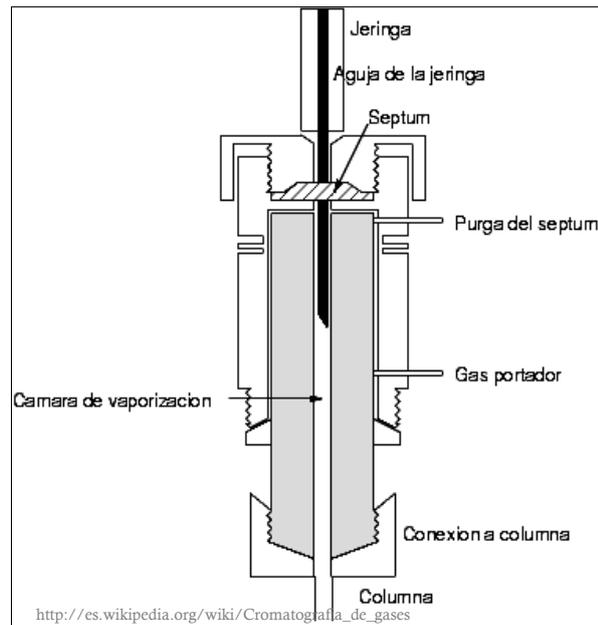
Colecta de ejemplares vegetales

Se recogieron muestras de las especies vegetales presente en túneles, cámaras y nidos de 10 individuos.

Análisis de presencia/ausencia de agrotóxicos por cromatografía gaseosa

Se utilizaron plantas completas y sedimento⁶ colectadas en los meses ya mencionados, para el análisis de presencia/ausencia de agrotóxicos. Se colocaron en sobres de manila rotulados por especie y mes. Se homogeneizaron en acetonitrilo dejando difundir los posibles tóxicos entre los vegetales y/o el sedimento y el solvente, durante 24 horas.

La cromatografía, en general, es una técnica analítica de separación con la cual es posible, cualificar y cuantificar los componentes de una mezcla. En un sentido amplio la cromatografía gaseosa, designa procesos basados en diferencias de velocidades con las cuales los componentes individuales de una mezcla, migran por un medio estacionario (disolvente) bajo la influencia de una fase móvil (gas



inerte). Al efectuar una separación por cromatográfica de gases, la muestra se vaporiza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se lleva a cabo mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de la mayoría de las otras técnicas cromatográficas la fase móvil no interactúa con las moléculas de los compuestos a separar, su única función es transportar los compuestos a través de la columna. La cromatografía de gas líquido es de las más utilizadas en Química Analítica por ser una técnica donde se trabaja con cantidades de muestras pequeñas, siendo una técnica de alta sensibilidad, gran exactitud y precisión, es selectiva con pocas interferencias permitiendo la separación de mezclas complejas y se obtienen datos analíticos reproducibles de alta confiabilidad.

Se distinguen tres pasos fundamentales en la determinación de compuestos:

⁶ Las mismas que se utilizaron para los análisis de nutrientes

EXTRACCIÓN del agroquímico de la matriz vegetal y/o el sedimento en acetónitrilo y traspaso a una fase separable.

PURIFICACIÓN del agroquímico (eliminación de otras sustancias interferentes). Los métodos de purificación no son generales para los distintos plaguicidas y algunos no lo son siquiera, para todos los plaguicidas de una misma familia. En general, los extractos pueden purificarse por partición con solventes distintos y/o por cromatografía en columnas diferentes (florisil, celite, sílica gel, alúmina o carbón activado).

DETERMINACIÓN Cualitativa y/o Cuantitativa. La identidad de un plaguicida debe confirmarse por un segundo método. Por ejemplo, un espectrómetro de masas.

Se utilizó cromatografía de intercambio gaseoso para el análisis de acuerdo al documento ITR INS 093 (Laboratorio Tecnológico del Uruguay). Los análisis están acreditados por United Kingdom Accreditation Agency, UKAS. Límite de detección ng/L.

Por su uso en las zonas hortifrutícolas, cultivos predominantes en zonas cercanas a Playa Penino y su peligrosidad, se escogieron los siguientes agrotóxicos: aldrin (insecticida clorado, uso prohibido), carbaryl (insecticida, carbamato), cypermctrina (insecticida, piretroide), chlorothalonil (funguicida e insecticida clorado de amplio espectro), chlorpyriphos (insecticida organofosforado), deltametrina (insecticida piretroide), dieldrin (insecticida clorado, uso prohibido), α , β y λ endosulfán (insecticida y acaricida organoclorado, prohibido), malation (insecticida organofosforado), metilchlorpyriphos (insecticida, organofosforado), metil parathion (organofosforado, prohibido), permetrina (insecticida, piretroide), procimidone (funguicida clorado).

Tratamiento de sedimentos para espectrometría de masas

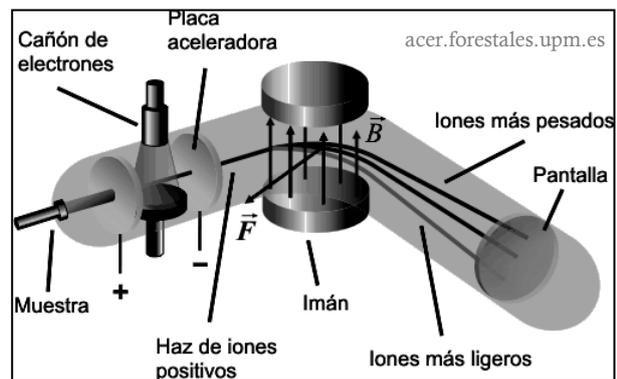
Los elementos traza están normalmente presentes en bajas concentraciones en el ambiente y en los organismos. Los micronutrientes y oligoelementos son elementos necesarios para los organismos y son parte de los elementos traza, sin embargo, no todos los elementos traza son micronutrientes. Muchos de ellos, son

metales pesados, cuya toxicidad varía de acuerdo a factores como la concentración y la valencia (CMA-JA, 1999).

El tratamiento de las muestras compuestas se realizó según norma ASTM D 3976 (Reap. 2005). Su digestión se realizó según método EPA 3051-A. La cuantificación de micronutrientes (sodio, calcio, hierro) y oligoelementos (cobre, cinc, manganeso, magnesio, potasio) se realizó de acuerdo a la norma ISO 11885:2007 adaptada para calcio, cinc, magnesio, manganeso, potasio y sodio por espectrometría atómica por emisión (ICP-OES) y por absorción (FAAS) según norma ASTM D 1068 adaptada para hierro, en el Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

La espectrometría de masas se fundamenta en la separación de partículas moleculares o atómicas por su diferente masa permitiendo la cuantificación de muchos elementos de interés para la industria, la agricultura, la minería, el monitoreo ambiental y la investigación científica básica. El proceso de la espectrometría de masas comprende básicamente cuatro etapas:

- Ionización de la muestra (se consigue por bombardeo mediante electrones).
- Aceleración de los iones por un campo eléctrico (conversión de una fracción significativa de los átomos formados en la etapa de ionización en un flujo de iones, generalmente positivos y de carga única.).
- Dispersión de los iones según su masa/carga (dado que la mayoría de los iones formados en la segunda etapa tienen una sola carga y que el resto de parámetros se mantienen constantes, la relación m/e^7 suele ser la masa del ión. La utilidad analítica de un espectrómetro de masas depende de la resolución del instrumento, o capacidad del mismo para separar dos partículas de diferente masa).
- Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica (una computadora conectada al espectrómetro recoge las distintas señales y las reproduce en forma de espectrograma, formato de fácil interpretación).



⁷ Donde e es la carga del electrón y m la masa.

En el sistema de entrada de muestras, un micromol o menos de muestra, se transforma al estado gaseoso por calentamiento a unos 400°C y se introduce lentamente en la cámara de ionización. La finalidad del sistema de entrada es permitir la introducción de una muestra representativa en la fuente de iones con la mínima pérdida de vacío.

El equipamiento utilizado incluye dos digestores (que implican la quema de la muestra) de alta presión con aplicación de microondas: MILESTONE MEGA 1200 y ANTON PAAR Multiwave 3000, dos espectrómetros de emisión atómica PERKIN ELMER modelos 4300 DV y 2100 DV y tres espectrómetros de absorción atómica PERKIN ELMER modelos 5000, Aanalyst 200 y Aanalyst 800.

Parámetro	mg/kg de sedimento	Método. Norma
Calcio	25,0	ASTM D 3976 + EPA 3051 + ISO 11885-2007
Cinc	5,0	ASTM D 3976 + EPA 3051 + ISO 11885-2007
Cobre	5,0	ASTM D 3976 + EPA 3051 + ISO 11885-2007
Hierro	10,0	ASTM D 3976 + EPA 3051 + ISO 8288:86
Manganeso	25,0	ASTM D 3976 + EPA 3051 + ISO 11885-2007
Potasio	25,0	ASTM D 3976 + EPA 3051 + ISO 11885-2007
Sodio	25,0	ASTM D 3976 + EPA 3051 + ISO 11885-2007

Análisis microbiológicos

Coliformes totales y fecales

En cada placa conteniendo medio agar Endo, se sembró por duplicado 1 ml de cada muestra de agua compuesta codificada como mayo, agosto, octubre y febrero y se incubaron a 35-37°C durante 48 horas. Se promediaron los duplicados y se contaron las placas donde las unidades formadoras de colonias (UFC), no superaban las 300 por placa como recomienda la convención de la Food and Drug Administration de Estados Unidos. Se utilizó el medio agar Endo (HiMedia) cuyos componentes son: peptona, lactosa, fosfato dipotásico, fucsina básica, sulfito sódico (pH=7.5). Los coliformes provenientes del intestino (coliformes incluyendo *Escherichia coli*) que fermentan lactosa, aparecen como colonias rojas y los que no lo hacen, se observan como colonias incoloras y brillantes. La producción de acetaldehído que se fija por sulfito sódico genera las diferencias de color (las colonias de *Salmonella* por ejemplo, aparecen como gotas transparentes). Es el medio recomendado por la American Public Health Association (APHA) y la Environmental Protection Agency (EPA) (Merck) para usarse en análisis de aguas

(DIFCO). Los análisis microbiológicos se realizaron en el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas *Clemente Estable*.

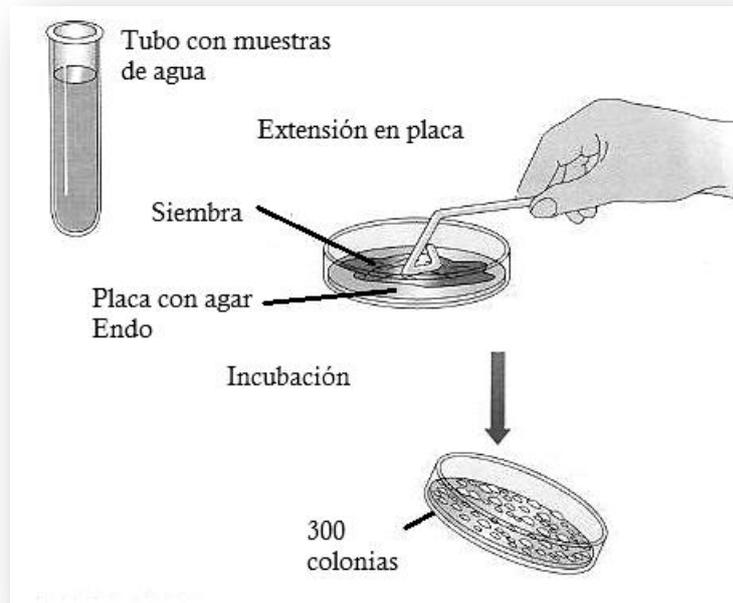


Figura 7. Procedimiento de cultivo en agar Endo

Se utilizó **caldo bilis verde brillante (BVB)** al 2% con campana de gas para confirmar la presencia de coliformes fecales (componentes: peptona, bilis de buey,

lactosa, verde brillante, pH=7.2). La

producción de burbujas de gas en el

medio indica presencia de coliformes

fecales. Este medio inhibe el

crecimiento de organismos distintos a

dichos coliformes. Es el medio

recomendado en los “Métodos

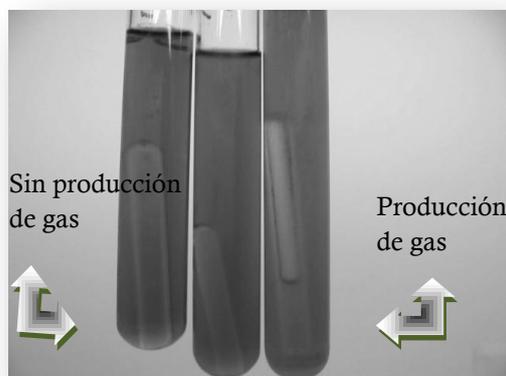
Estándares para el Examen de Aguas

y Aguas Residuales” (DIFCO) y por la

APHA (Merck). Se realizó la incubación de tubos conteniendo BVB con muestras

de agua de (1 mL de cada muestra compuesta), a 45°C durante 48 horas (siembra

por triplicado).



Lámino-cultivos

Las láminas por contacto Envirocheck (Merck) se pueden utilizar para evaluar contaminación en líquidos o superficies. Se sumergió el lámino-cultivo en



la muestra de agua a analizar durante 10 segundos. Se cerró el frasco que porta los medios: Plate Count Agar (PCA) para el conteo de bacterias aerobias mesófilas totales y Violet Red Bile Dextrose (VRBD) Agar (la degradación de dextrosa genera ácido que provoca un cambio de color a rojo), recomendado por la Organización para la Estandarización (ISO) y el Ministerio

Alemán de Salud para el aislamiento y conteo de Enterobacterias. Se incubaron durante 48 horas a 44°C. En ambos medios *E. coli*, *S. typhimurium* y *S. sonnei* presentan buen crecimiento.

Análisis estadísticos

La normalidad y homocedasticidad de los datos obtenidos usando los biomarcadores de daño genético; ensayo cometa y test de MN se testó en base a los métodos de Kolmogorov-Smirnov para normalidad y Levene así como test de Tukey para homocedasticidad (Zar, 2010). Para comparar los datos de las variables mencionadas se utilizaron el análisis de varianza (ANOVA) para datos paramétricos y test de Kruskal Wallis para datos no paramétricos. Los datos de todos los estudios se graficaron y se analizaron las relaciones entre las variables mediante análisis de correlaciones y de escalamiento multidimensional (multidimensional scaling MDS). Los programas estadísticos utilizados fueron Statistica 6.1, Statgraph Centurion XVI.I y BioEstat.

Resultados

Ensayo de electroforesis en células individuales (SCGE)

En el Gráfico 1 se presentan los valores medios de la variable % de ADN dañado en linfocitos de *Ctenomys*, obtenidos en cada muestreo (mayo, 17,11 %; agosto, 44,97 %; octubre, 51,91 %, febrero, 31,4 % y control, 5,1 %). En el Gráfico 2 se muestran los valores medios para la variable Tail moment Olive (mayo, 2,06; agosto, 7,45; octubre, 11,99; febrero, 9,08 y control, 0,24).

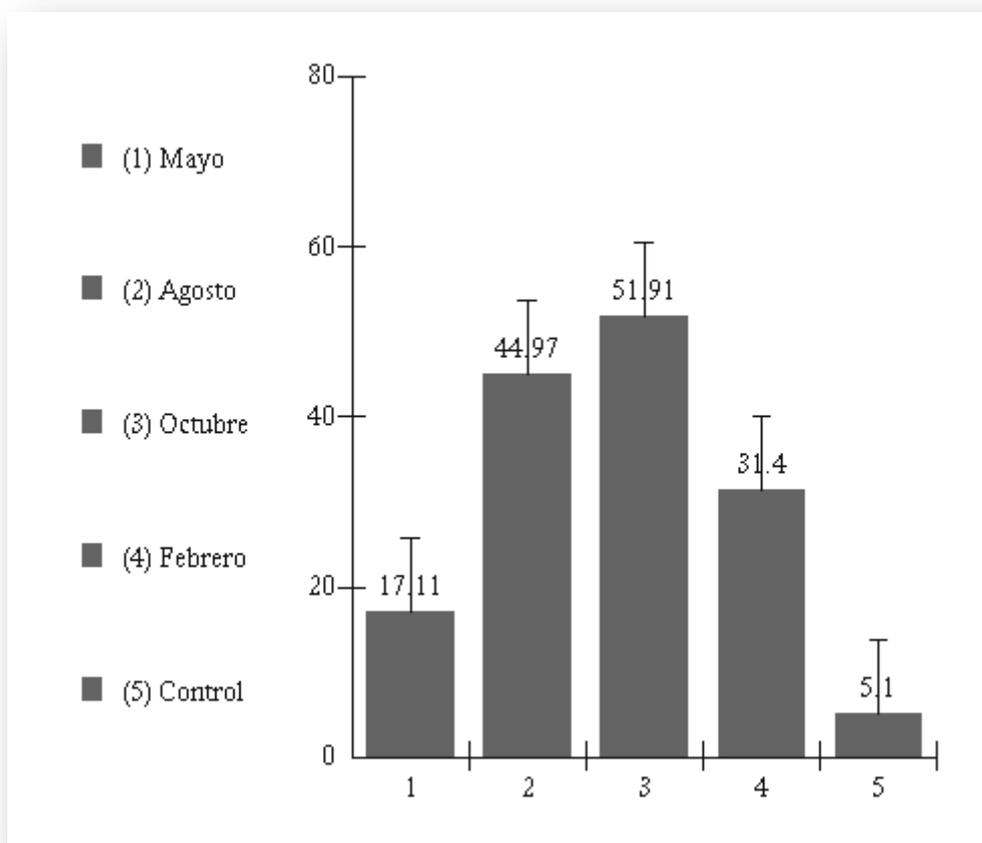


Gráfico 1. Se muestra la distribución de las medias para la variable % de ADN dañado con el correspondiente error estándar para los meses en los que se tomaron las muestras

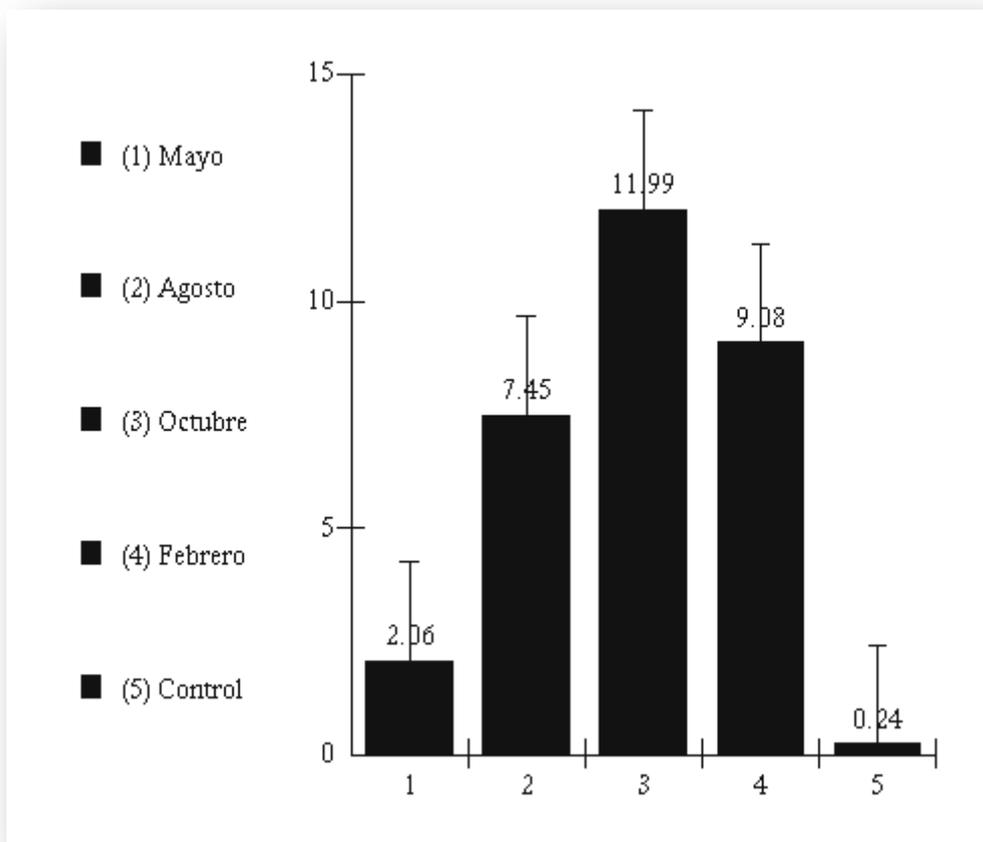


Gráfico 2. Se muestra la distribución de las medias para la variable TMO con el correspondiente error estándar para los meses en los que se tomaron las muestras

Ambas variables son normales de acuerdo a Kolmogorov-Smirnov y presentan homogeneidad de varianzas de acuerdo a los test de Levene y Tukey. El ANOVA muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0.01$) entre las muestras tanto para TMO como para % de ADN dañado. No se constataron diferencias significativas entre sexos, por lo que se analizaron los datos sin diferenciar machos de hembras.

Test de micronúcleos

En el Gráfico 3 se resumen los valores (en %) de eritrocitos policromáticos y de MN para los meses muestreados. No existen diferencias entre sexos por lo cual se analizaron los datos sin distinguir entre machos y hembras. Se contabilizaron 2000 eritrocitos por frotis en duplicado y se promediaron los valores por individuo. Solo se contabilizaron eritrocitos policromáticos, dadas las características del bazo de *Ctenomys*, que extrae los glóbulos rojos que presentan anomalías de la circulación, no detectándose eritrocitos maduros o normocromáticos (NCE).

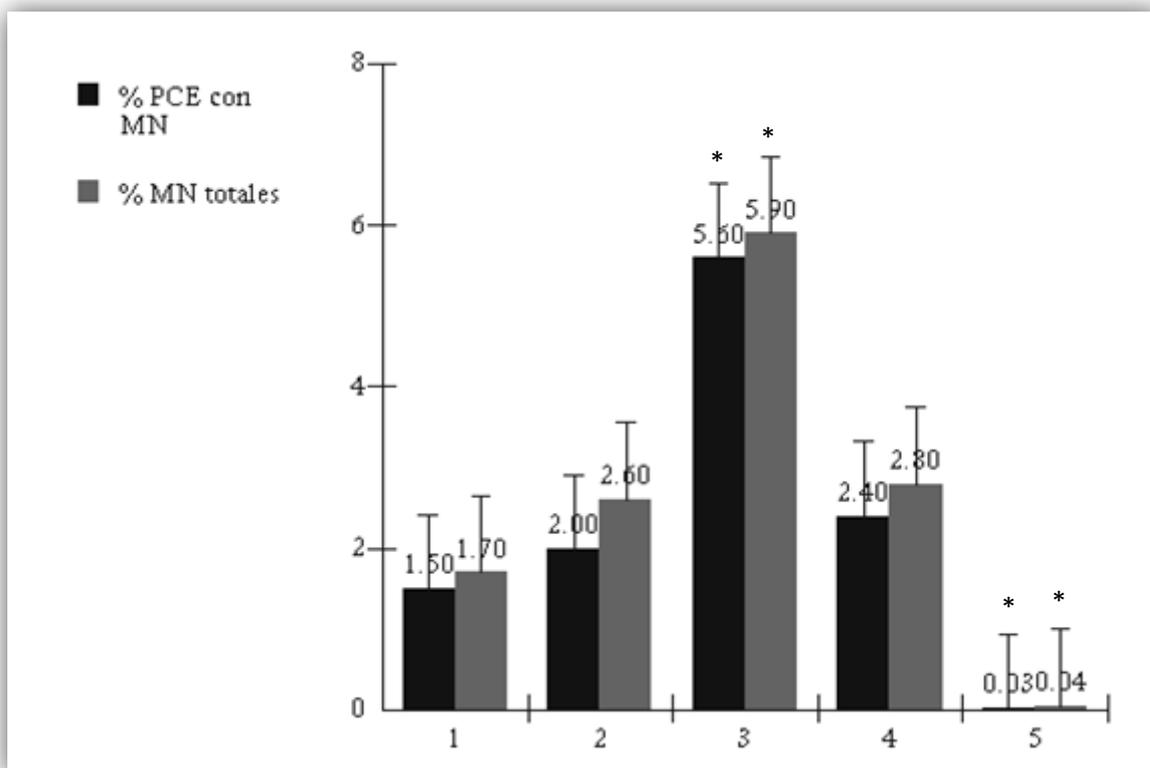


Gráfico 3. En negro se representan las medias para el porcentaje de eritrocitos conteniendo MN (% PCE con MN) y en gris las medias para el porcentaje de MN totales (% MN totales) para los meses en los cuales se tomaron las muestras: 1. Mayo; 2. Agosto; 3. Octubre; 4. Febrero; 5. Control

Ambas variables se compararon a través del análisis no paramétrico Kruskal-Wallis, por no cumplir con las condiciones de normalidad y homocedasticidad. El análisis muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la muestra de octubre y el resto tanto para la variable % PCE con MN como para el % MN. Todas las muestras se diferenciaron significativamente del control ($p < 0.05$).

Análisis de *Allium* test

El Gráfico 4 muestra inhibición de la mitosis estadísticamente significativa ($p < 0.05$) para todas las muestras expuestas al agua superficial del humedal de Playa Penino, en relación al control (agua destilada) de acuerdo a test de Kruskal-Wallis. Se observa que la mayor disminución de la división celular se produce en la muestra de octubre, siendo la muestra que corresponde a agosto la que menos inhibe la división celular. No hay diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis).

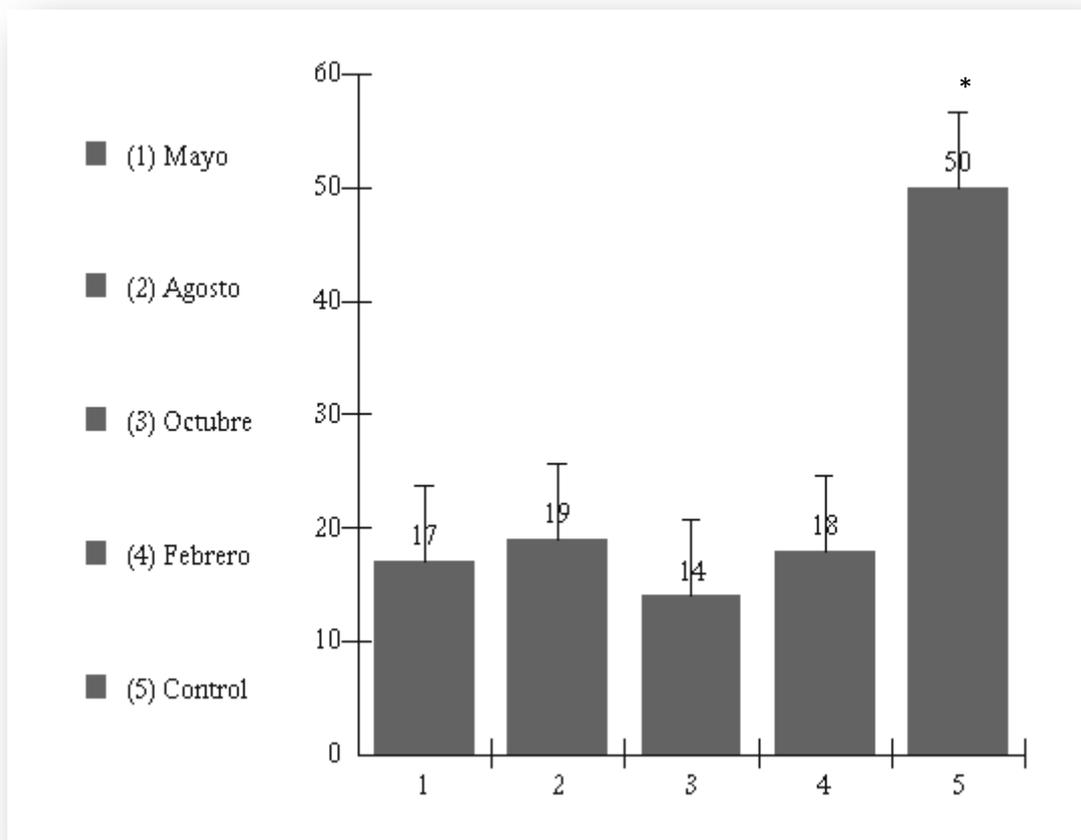


Gráfico 4. Índice mitótico de células meristemáticas de *Allium* expuestas a muestras de agua compuestas para los meses indicados. A menores valores, mayor inhibición de la división celular por factores citotóxicos o genotóxicos (* dif. sign. a $p < 0.05$)

En el Gráfico 5 se aprecia que al igual que en el test de MN en sangre periférica de *Ctenomys*, la muestra de agua del humedal de Playa Penino que corresponde al mes de octubre, provoca mayor formación de MN en las células de meristema apical de cebolla ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis). Con respecto a las aberraciones, hay un aumento significativo ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis) en la muestra de octubre en relación a las demás, seguida por la de febrero y la de agosto (diferencias no significativas), confirmando la tendencia de los resultados del test de MN para *Ctenomys*. Ambas variables, se diferencian significativamente del control para todas las muestras, excepto las aberraciones en las muestras de agosto y febrero ($p < 0.05$).

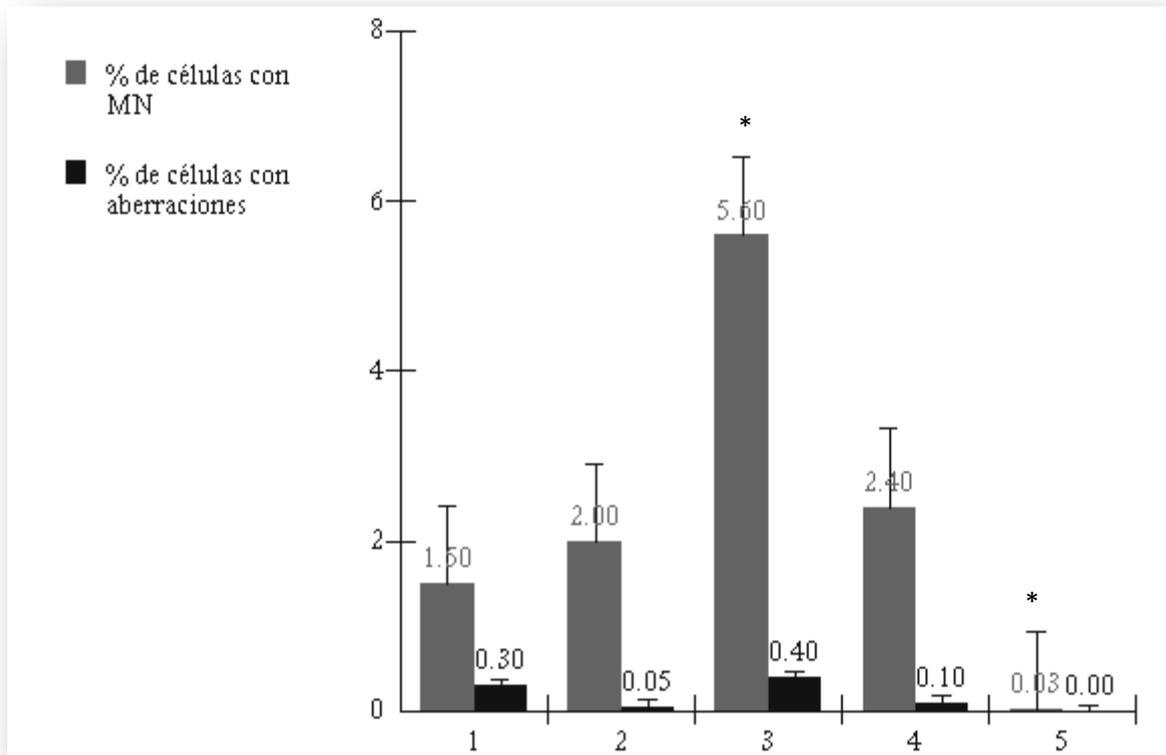


Gráfico 5. Resultados del *Allium* test para muestras de agua de las orillas del humedal: 1. Mayo; 2. Agosto; 3. Octubre; 4. Febrero; 5. Control. En gris se representa el porcentaje de MN en células meristemáticas y en negro el porcentaje de células meristemáticas con aberraciones (* dif. sign. a $p < 0.05$)

Entre las aberraciones observadas se cuentan anafases y telofases con puentes (bridges) metafases con cromosomas “pegajosos” (sticky chromosomes) y metafases con cromosomas rezagados (algunas se muestran en la Figura 8)

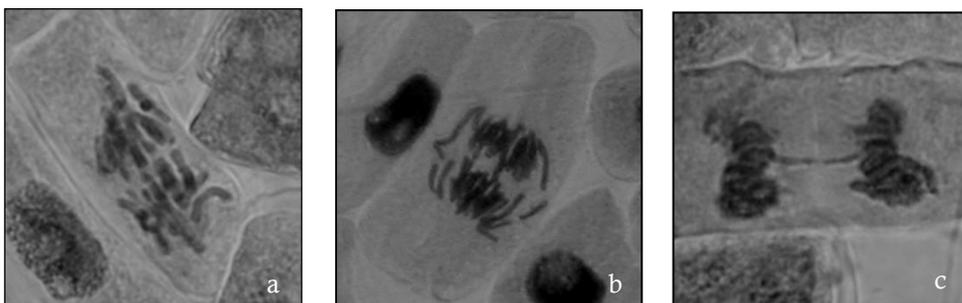


Figura 8. De izquierda a derecha: a. b. Anafases con puentes y cromosomas no unidos al huso mitótico; c. Telofase con puente.

Determinación de parámetros físico-químicos

Los resultados de los análisis de las muestras de agua muestran un descenso del nitrógeno total (NT) en la muestra de octubre ($1095 \mu\text{g/L}$), siendo su valor similar en las muestras de agosto y febrero ($1584 \mu\text{g/L}$ y $1650 \mu\text{g/L}$,

respectivamente) y mayor que en octubre. Su valor máximo se registra en la muestra de mayo (1954 $\mu\text{g/L}$). En el caso del fósforo total (PT), sus valores mínimos se registran en las muestras de agosto y octubre (190 $\mu\text{g/L}$ y 188 $\mu\text{g/L}$), y sus valores máximos en las de mayo y febrero (878 $\mu\text{g/L}$ y 751 $\mu\text{g/L}$). El fosfato se comporta de manera similar al PT y los nitratos permanecen relativamente constantes para todas las muestras, experimentando un aumento en la muestra mayo (164 $\mu\text{g/L}$). El amonio por otra parte, registra su valor mínimo en esa misma muestra (137 $\mu\text{g/L}$), aumentando en las de agosto y octubre (342 $\mu\text{g/L}$ y 965 $\mu\text{g/L}$), donde alcanza su valor máximo, volviendo a disminuir en la de febrero (812 $\mu\text{g/L}$) (Gráfico 6).

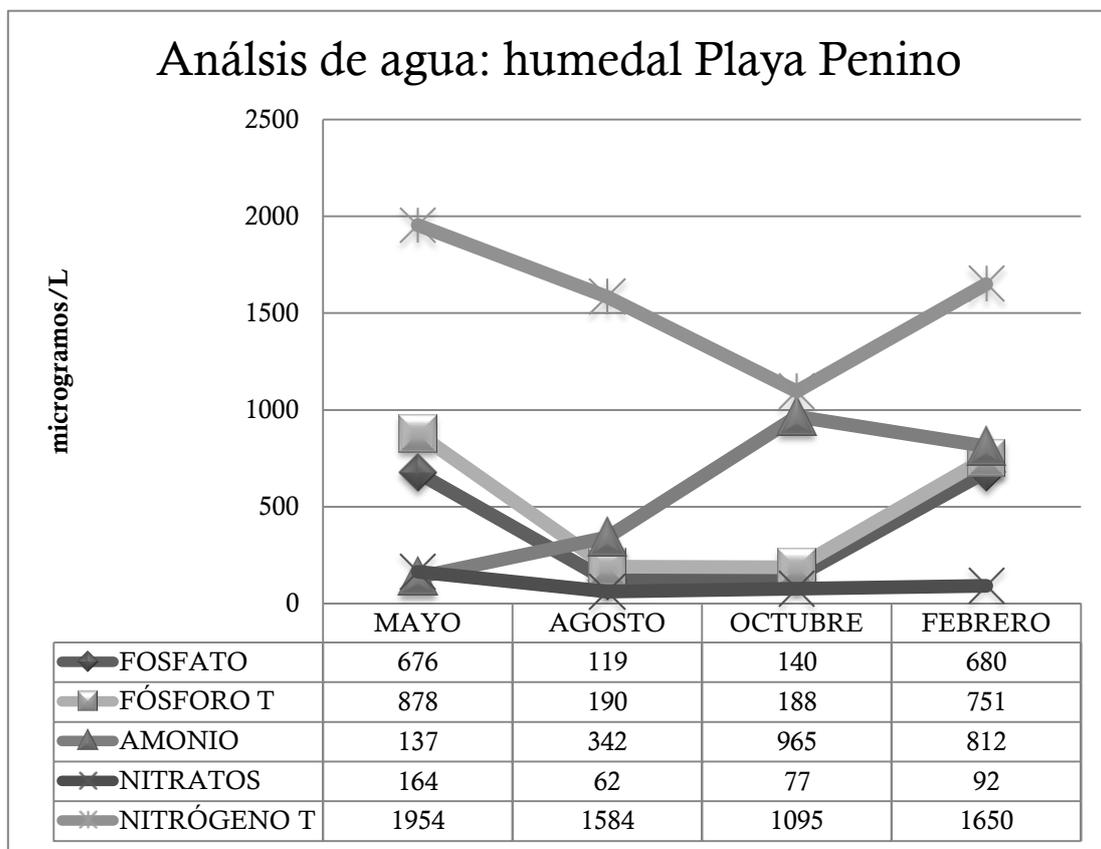


Gráfico 6. Se grafican los datos correspondientes a distintos parámetros de nutrientes correspondientes a cada muestra compuesta tomada en los meses detallados en la metodología

Los valores medios de nutrientes relacionados con el fósforo son 501,8 $\mu\text{g/L}$ para PT y 403,8 $\mu\text{g/L}$ para el fosfato. En cuanto a los aportes relativos al nitrógeno los valores medios para NT son de 1570,8 $\mu\text{g/L}$, 564 $\mu\text{g/L}$ para el amonio y 98,8 $\mu\text{g/L}$ para el nitrato.

En las muestras de sedimento, se constató una disminución pronunciada en la muestra de agosto (10,4 $\mu\text{g/g}$) para el NT y los valores máximos (6 veces mayor

que en agosto) se registraron en las muestras de mayo y febrero. El PT se mantuvo relativamente estable para todas las muestras, excepto en la de agosto donde disminuyó aproximadamente a la mitad (12,5 $\mu\text{g/g}$) (Gráfico 7). El valor medio para las muestras de sedimento de PT fue de 21,4 mg/Kg y de 43,2 mg/Kg para el NT.

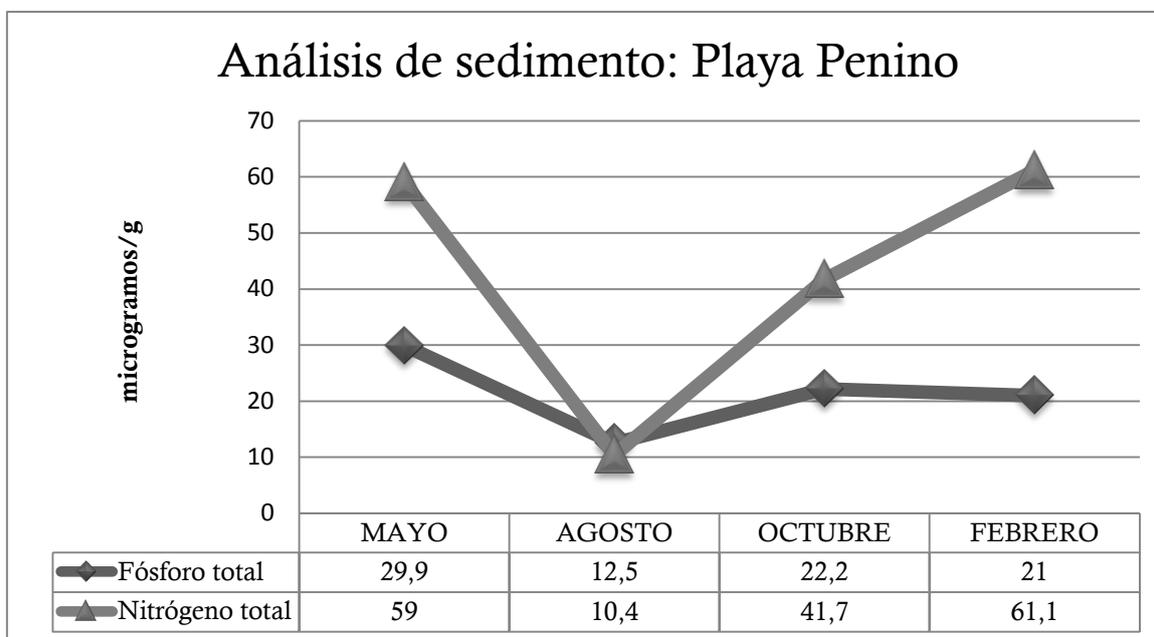


Gráfico 7. Se muestran los resultados de nutrientes en sedimento para cada muestra compuesta en los meses detallados

Las muestras de suelo por el contrario, registran valores máximos de NT en la muestra de octubre (86,7 $\mu\text{g/g}$), disminuyendo en las otras. Los valores mínimos se registraron para las muestras de febrero y mayo. El PT sin embargo, se mantiene constante en las muestras de mayo y agosto y experimenta un marcado aumento de cuatro veces para la de octubre (34 $\mu\text{g/g}$) y del doble en la de febrero (63,5 $\mu\text{g/g}$) (Gráfico 8).

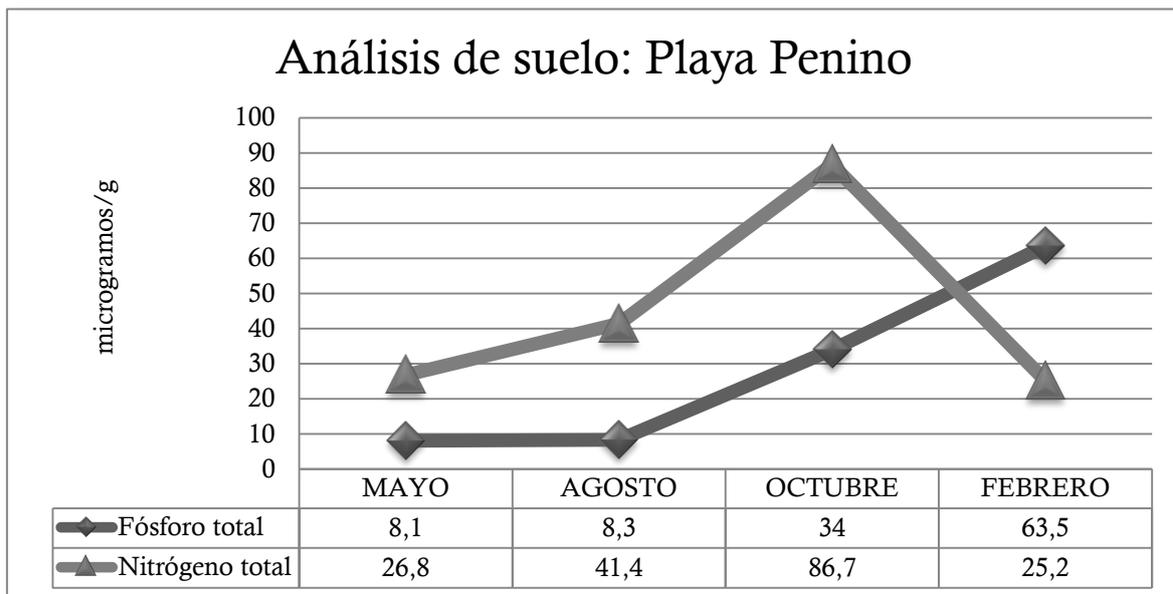


Gráfico 8. Se muestran los resultados de nutrientes para cada muestra compuesta de suelo

El valor medio de PT para las muestras de suelo es de 28,5 mg/Kg y 45 mg/Kg para el NT. Las mediciones de pH (realizadas por método colorimétrico) se mantuvieron en todas las **muestras** entre 5.4 y 6.0.

Determinación de plaguicidas y micronutrientes

Los valores medios obtenidos para nutrientes (sodio, calcio, hierro) en las muestras de sedimento fueron las siguientes: sodio (38,5 mg/Kg), calcio (770 mg/Kg), hierro (1500 mg/Kg). Los valores obtenidos para oligoelementos (cobre, cinc, manganeso, magnesio, potasio) en dichas muestras se detallan a continuación: cobre (1,2 mg/Kg), zinc (2,9 mg/Kg), manganeso (18,5 mg/Kg), magnesio (180 mg/Kg), potasio (240 mg/Kg). Ninguna muestra superó los estándares internacionales.

Parámetros microbiológicos

En el Gráfico 9 cada barra representa el 100 % de los microorganismos detectados de acuerdo a la metodología descrita (aerobios mesófilos totales, coliformes totales y enterobacterias) para cada muestra compuesta de los meses detallados en la metodología.

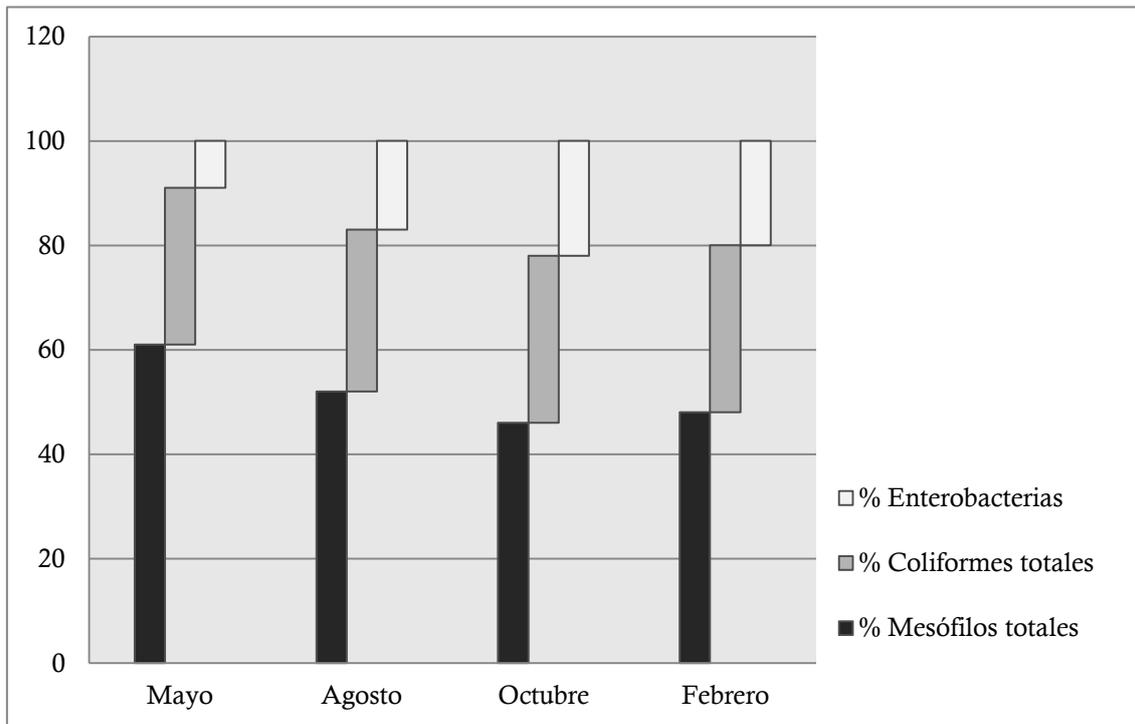


Gráfico 9. Determinación de microorganismos aerobios mesófilos totales, coliformes totales y enterobacterias en muestras de agua compuestas de las orillas del mayor humedal de Playa Penino.

Aunque las diferencias no resultaron significativas de acuerdo al test no paramétrico de Kruskal Wallis ($p < 0.05$) entre las muestras compuestas de agua, se aprecia un aumento de las enterobacterias en las muestras correspondientes a octubre y febrero con respecto a las de mayo y agosto. Las bacterias mesófilas predominan en todas las muestras (abarcando entre un 48-61% del total de microorganismos), seguidas por los coliformes totales (que se mantuvieron cercanos a un 30% en todas las muestras). La variación más amplia se observó en las enterobacterias que oscilaron desde 9% en la muestra de mayo hasta 22% en la muestra de octubre. En el caso de los coliformes totales, para todas las muestras analizadas hubo producción de gas en el caldo verde bilis brillante evidenciándose la presencia de enterobacterias, lo que se confirmó luego con los lámino-cultivos. El recuento de enterobacterias fue de 300 ufc/100 ml en mayo, 800 ufc/100 ml en agosto, 1500 ufc/100 ml en octubre y 1300 ufc/100 ml en febrero. El promedio para todas las muestras es de 975 ufc/100 ml.

Análisis de correlación y MDS

El análisis de correlaciones (Tabla 1) muestra índices de correlación significativos ($p < 0,05$) entre los marcadores de daño agudo (ensayo cometa) y daño crónico (test de MN). El % de aberraciones detectado por el *Allium* test registrado luego de la exposición de las muestras compuestas de agua, también se correlaciona significativamente con los marcadores de daño genético medidos *in situ*, a partir de las muestras de sangre de los individuos de *Ctenomys* de Playa Penino.

	%ADN dañado	TMO	%PCE	%MN	IM <i>Allium</i>	%MN <i>Allium</i>	%Ab. <i>Allium</i>	Fosfato agua	PT agua	Amonio agua	Nitrato agua	NT agua	PT sed	NT sed	Enterob
%ADN dañado	1	0,982	0,9616	0,9537	-0,8172	0,5611	0,9722	-0,3597	-0,4384	0,9802	-0,4304	-0,8945	0,0109	0,1476	0,8872
	p= ---	p=,018	p=,038	p=,046	p=,183	p=,439	p=,028	p=,640	p=,562	p=,033	p=,570	p=,106	p=,989	p=,852	p=,113
TMO		1	0,8926	0,8843	-0,7383	0,4693	0,9851	-0,2211	-0,3196	0,9693	-0,4131	-0,825	0,0258	0,2582	0,975
		p= ---	p=,107	p=,116	p=,262	p=,531	p=,015	p=,779	p=,680	p=,031	p=,587	p=,175	p=,974	p=,742	p=,049
%PCE			1	0,9958	-0,8658	0,6382	0,8956	-0,5535	-0,6003	0,812	-0,4521	-0,9466	-0,0386	-0,0431	0,7884
			p= ---	p=,004	p=,134	p=,362	p=,104	p=,446	p=,400	p=,188	p=,548	p=,053	p=,961	p=,957	p=,212
%MN				1	-0,8178	0,5705	0,903	-0,6095	-0,661	0,8227	-0,5314	-0,9722	-0,1301	-0,1181	0,8145
				p= ---	p=,182	p=,430	p=,097	p=,391	p=,339	p=,177	p=,469	p=,028	p=,870	p=,882	p=,185
IM <i>Allium</i>					1	-0,934	-0,6607	0,2426	0,2398	-0,555	-0,0512	0,6649	-0,4462	-0,2844	-0,4591
					p= ---	p=,066	p=,339	p=,757	p=,760	p=,445	p=,949	p=,335	p=,554	p=,716	p=,541
%MN <i>Allium</i>						1	0,3559	-0,0665	-0,0182	0,2386	0,3734	-0,3785	0,6755	0,3803	0,1173
						p= ---	p=,644	p=,934	p=,982	p=,761	p=,627	p=,621	p=,325	p=,620	p=,883
%Ab. <i>Allium</i>							1	-0,3427	-0,4478	0,9868	-0,5637	-0,8834	-0,1462	0,1058	0,9697
							p= ---	p=,657	p=,552	p=,013	p=,436	p=,117	p=,854	p=,894	p=,030
Fosfato agua								1	0,9887	-0,2442	0,7474	0,7333	0,6686	0,8521	-0,3573
								p= ---	p=,011	p=,756	p=,253	p=,267	p=,331	p=,148	p=,643
PT agua									1	-0,3651	0,8319	0,7938	0,721	0,8226	-0,481
									p= ---	p=,635	p=,168	p=,206	p=,279	p=,177	p=,519
Amonio agua										1	-0,5708	-0,8135	-0,1723	0,1599	0,9852
										p= ---	p=,429	p=,187	p=,828	p=,840	p=,015
Nitrato agua											1	0,7118	0,8977	0,676	-0,7026
											p= ---	p=,288	p=,102	p=,324	p=,297
NT agua												1	0,3587	0,3099	-0,8451
												p= ---	p=,641	p=,690	p=,155
PT sed													1	0,8342	-0,3385
													p= ---	p=,166	p=,662
NT sed														1	0,0028
														p= ---	p=,997
Enterob															1

Tabla 1. Test de correlaciones para los marcadores de daño genético *in situ* (*Ctenomys*), *in vitro* (*Allium* test) y variables ambientales (nutrientes y enterobacterias). Abreviaciones que no aparecen aclaradas en el texto: %PCE, eritrocitos portadores de MN; IM *Allium*, índice mitótico medido en *Allium* test; %Ab. *Allium*, porcentaje de aberraciones registradas en *Allium* test

El porcentaje de enterobacterias se correlaciona positivamente y de forma significativa con la variable TMO, que indica daño genético *in situ* (sobre las muestras de sangre de *Ctenomys*) y con el porcentaje de aberraciones cromosómicas registrados en el *Allium* test realizado *in vitro* a partir de las muestras sobre las que se midieron también los nutrientes. En relación a estos últimos, la concentración de amonio se correlaciona en forma positiva ($p < 0,05$) con las variables genéticas que indican exposición y daño genético agudo (% ADN dañado y TMO), crónico (% PCE y % MN) y con el porcentaje de aberraciones registrado por el *Allium* test. El porcentaje de enterobacterias se correlaciona positiva y significativamente con la concentración de amonio en agua. Debido a que existe autocorrelación entre las variables TMO y porcentaje de ADN dañado, se escogerá solo una para el análisis de escalamiento multidimensional del mismo modo que en el caso del fosfato y el fósforo total en agua (solo se incluirá una de las dos variables). Por el mismo motivo, se excluyeron los porcentajes de microorganismos mesófilos y coliformes totales y se incluyeron los porcentajes de enterobacterias. Las concentraciones de PT y NT total en suelo no se incluyeron por ser muy bajas.

En el Gráfico 10, se observan las dos dimensiones que generó el análisis de escalamiento multidimensional (MDS). La medida de stress fue de 0,029 lo cual indica una bondad de ajuste muy buena (Zar, 2010). La dimensión 1 agrupa los parámetros que indican daño genético agudo y crónico *in situ* (% ADN dañado y % MN) así como aquellos que miden daño genético *in vitro*, registrados a través del *Allium* test (% de aberraciones y % de MN en células meristemáticas de *Allium*), con las variables ambientales vinculadas con la presencia de enterobacterias y la concentración de amonio en agua. Por otro lado, vincula la inhibición en la multiplicación celular (IM *Allium*) de las células meristemáticas de *Allium* con el resto de las variables ambientales (concentración de NT y PT en agua y sedimento, así como concentración de nitrato en agua).

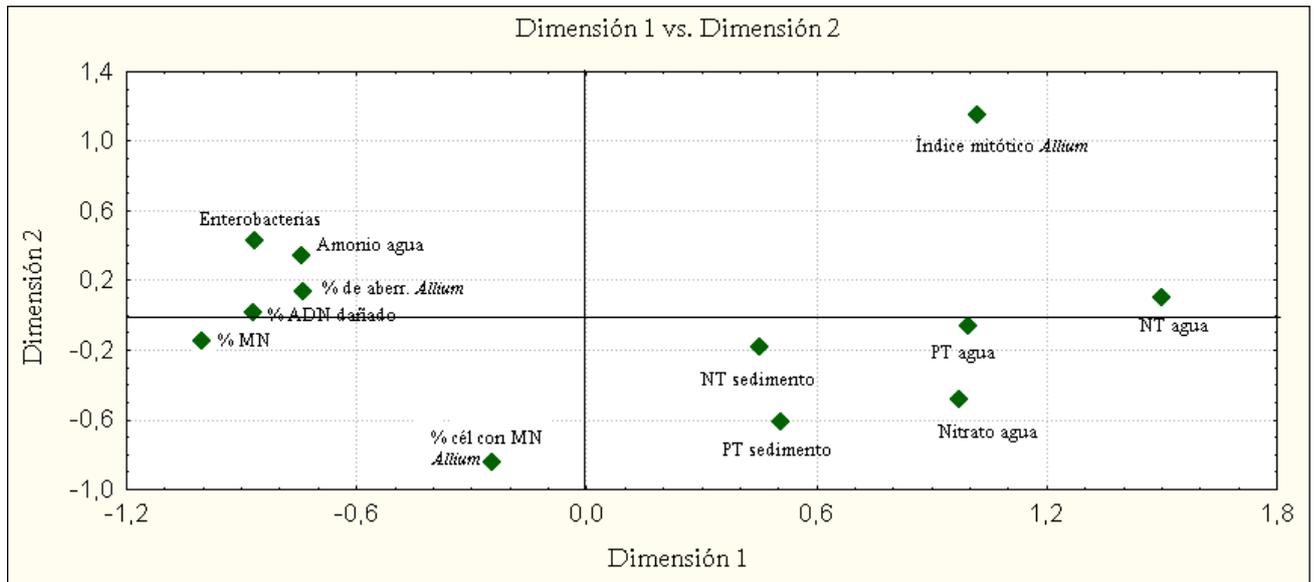


Gráfico 10. Análisis de escalamiento multidimensional de marcadores de daño genético y variables ambientales.

La dimensión 2 por otra parte agrupa las variables de daño genético agudo (% ADN dañado, % de aberraciones en *Allium*) y la inhibición en la multiplicación celular del meristema de *Allium*, con las enterobacterias y la concentración de amonio. Por otro lado se agrupan, los marcadores de daño genético crónico (% MN en *Ctenomys* y en *Allium*, en los ensayos *in situ* e *in vitro*, respectivamente), con el resto de las variables ambientales (concentración de NT y PT en agua y sedimento y concentración de nitrato en agua).

Discusión

Biomarcadores de genotoxicidad

El término biomarcador puede ser definido como un indicador de eventos celulares y moleculares en sistemas biológicos que revela la relación entre el estado del ambiente y sus efectos en un organismo. Juegan un papel clave en la comprensión de la relación entre la exposición a tóxicos ambientales y el desarrollo de incipientes procesos de deterioro que ocurren en un organismo. Asimismo, son fundamentales en la identificación de situaciones de potencial peligro a niveles subletales, frente a la concentración de uno o varios tóxicos en los ecosistemas (Ribeiro y cols, 2003; Mudry y Carballo, 2006).

Los marcadores de genotoxicidad en el área ambiental, se utilizan con dos propósitos: evaluar el riesgo de animales y plantas que habitan un ambiente

expuesto a xenobióticos y evaluar el riesgo de poblaciones humanas expuestas a contaminantes presentes en alimentos, agua o ambiente circundante en general (Clemente y cols, 2004; Machella y cols, 2006; Emmanouil y cols, 2007; Kumar y cols, 2010; Chakraborty y cols, 2009; Yin y cols, 2009; Mhoanty y cols, 2011; Parolini y cols, 2011; Capriglione y cols, 2011).

Los porcentajes de eritrocitos policromáticos (de sus siglas en inglés PCEs) micronucleados así como de micronúcleos (% MN), muestran la existencia de daño genético crónico reciente y sus valores (0,65-1,2%), superan los obtenidos por Heuser y cols. (2002), en tucu tucus expuestos a contaminación por metales pesados en dos de tres localidades sobre la ruta RS/030, sobre la costa en Rio Grande del Sur (0,76%). También son superiores a las frecuencias de PCEs (1,75-2,7%) obtenidos por da Silva y cols. (2000) en individuos de *Ctenomys* expuestos a contaminación por explotación minera de carbón en la localidad de Candiota (1,3%). Rico-Rodríguez y cols. (2004), hallaron valores medios de MN para peces de 0,55% en lagos no contaminados y 2,7% en zonas altamente contaminadas por eutrofización.

En el caso del porcentaje de ADN dañado, el valor medio obtenido en este trabajo es de 36,2%. Kopjar y cols. (2008), hallaron valores de daño genético medidos por el ensayo cometa de 0,85-7,37 para porcentaje de ADN dañado y de 0,11-0,86 para tail moment Olive (TMO), en sangre periférica de peces de ríos que presentan contaminación por efluentes urbanos, menores a los hallados en este trabajo, mostrando la existencia de daño agudo o exposición reciente a sustancias genotóxicas.

El índice mitótico (IM) obtenido al exponer células meristemáticas de *Allium cepa* a las muestras de agua de las orillas del humedal de Playa Penino, equivale al hallado por Fiskesjö (1988) al someter bulbos de esta especie a una solución de 0,4 mg/L de compuestos de mercurio (cuya mutagenicidad es considerada muy alta) y es superior al obtenido por exposición de esta especie a soluciones de suelos agrícolas sometidos a intensa fertilización y tratamientos con agroquímicos por Dragoeva y cols. (2009) (4,8 a 7,7). El valor medio anual de aberraciones encontradas en este estudio es de 1,2 y el de células con MN es de 0,2. La frecuencia de aberraciones es superior (0,56-0,87) y la de MN similar (0,1-0,47) a las descritas por los autores mencionados. El tipo de aberración más frecuente hallado indica que las muestras de agua analizadas por el *Allium* test, contienen xenobióticos que provocan rupturas cromosómicas y

anormalidades en el huso mitótico. La ruptura cromosómica se confirma por la presencia de MN (Monte y cols, 2007; Dragoeva y cols, 2009). Cabe destacar, que los valores de inhibición de la multiplicación celular (medida por el IM en el *Allium test*) son similares a los hallados por Monte y cols, (2007) en un sitio de muestreo ubicado aguas abajo de un área de liberación de efluentes industriales, en el río Pitimbú (ciudad de Natal, Brasil).

Parámetros ambientales

En términos generales, de acuerdo al DECRETO 253/79 para calidad de aguas, el humedal de Playa Penino corresponde a la CLASE 2 ((b) *Aguas destinadas a recreación por contacto directo con el cuerpo humano para muchos residentes y visitantes de la zona*) y a la CLASE 3 (*Aguas destinadas a la preservación de los peces en general y de otros integrantes de la flora y fauna hídrica, o también aguas destinadas al riego de cultivos cuyo producto no se consume en forma natural o en aquellos casos que siendo consumidos en forma natural se apliquen sistemas de riego que no provocan el mojado del producto*). Para cualquiera de las dos clases, el valor de amonio hallado excede los límites permitidos en todas las muestras (límite permitido 0.02 mg/L). Lo mismo sucede para el fósforo total (PT, límite permitido 0.025 mg/L). Contrariamente, los nitratos se encuentran muy por debajo de los límites fijados por este decreto (10 mg/L).

El valor promedio de 501, 8 µg /L para el fósforo total (PT) y de 1570,8 µg/L para el NT, indican que es un ambiente hipereutrófico (Mazzeo y cols, 2002; Kruk y cols, 2006; Arocena y cols, 2008) y entre eutrófico e hipereutrófico para la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y el Desarrollo (FAO, 1997). Para Arocena y cols. (2008) el valor medio de NT corresponde a un ambiente eutrófico. El valor promedio de PT (0.5mg PT/L), supera el estándar nacional de PT para todo tipo de aguas. Según Chalar y cols. (2011) los valores de PT hallados indican hipereutrofización, aunque en dicho trabajo, el estado trófico se define por la concentración total de fósforo y por el índice de estado trófico para invertebrados bentónicos (de sus siglas en inglés TSI-BI). El valor promedio de PT supera a los hallados por Arocena y cols. (2008) para los embalses de Canelón Grande (457 µg/L) y Paso Severino (247 µg/L), lo que no sucede con los valores promedio de NT (4884 µg/L para Canelón Grande y 4962 µg/L para Paso Severino).

En cuanto a los aportes relativos al nitrógeno los valores medios para NT son de 1570,8 µg/L, 564 µg/L para el amonio y 98,8 µg/L para el nitrato. El valor medio de nitrato, así como sus valores máximos (0,16 mg NO₃/L) se encuentran por debajo de los estándares nacionales e internacionales (Arocena y cols, 2008).

El valor internacional para NT es de (1.87 mg/L) es mayor que el valor medio estimado para el humedal de Playa Penino, (se recurre a la normativa internacional US EPA (2010) al no existir reglamentación nacional al respecto). Solo en la muestra de mayo, este valor es superado por el registrado en este humedal.

Los máximos de amonio (0.56 mg NH₄/L) superaron no solo estos rangos, sino los valores internacionales tanto para la preservación de la vida acuática como para el agua potable (Arocena y cols, 2008). El amonio tiene escasa acción tóxica por sí mismo, pero su existencia aún en bajas concentraciones, puede significar contenido aumentado de bacterias fecales y microorganismos patógenos en el agua. La formación del amonio se debe a la descomposición bacteriana de urea y proteínas, siendo la primera etapa inorgánica del proceso. Para algunos autores, el amonio constituye un buen indicador químico indirecto de contaminación fecal en las aguas (Laws, 1993; Rodríguez y cols, 2006).

En cuanto a la relación nitrógeno fósforo (N:P) en agua, en la bibliografía varía de 15:1 a 10:1 (Márquez y cols, 2007), otros autores proponen una relación de 9:1 a 7:1 (Salas, 1996) que no se cumple para el humedal de Penino, tal vez por un exceso de aporte de fósforo proveniente de los aportes naturales y los efluentes cloacales. En este caso el nutriente limitante sería el nitrógeno.

Los valores medios de nutrientes relacionados con el fósforo son 501,8 µg/L para PT y 750 µg/L para el fosfato, por encima de los estándares nacionales e internacionales. La concentración de fosfatos en agua natural es fundamental para evaluar el riesgo de eutrofización. El fósforo suele ser el factor limitante en los ecosistemas para el crecimiento de los vegetales, y un gran aumento de su concentración puede provocar la eutrofización de las aguas. Así, los fosfatos están directamente relacionados con la eutrofización de ríos, pero especialmente de lagos y embalses. Tan sólo 1 gramo de fosfato (PO₄) provoca el crecimiento de hasta 100 gramos de algas. Si el crecimiento de algas es excesivo, los procesos de su descomposición pueden dar como resultado una alta demanda de oxígeno, agotando el oxígeno presente en el agua. La directiva EU 91/271/CEE indica que las concentraciones críticas para una eutrofización incipiente se encuentran entre

0,1-0,2 mg/L PO₄ en el agua corriente y entre 0,005-0,01 mg/L PO₄ en aguas tranquilas (De Azevedo y Da Matta, 2004; Márquez y cols, 2007). El fósforo a diferencia del nitrógeno no se obtiene de la atmósfera, es parte de los productos de excretas de los seres vivos y se encuentra contenido principalmente en los fertilizantes, pesticidas, detergentes y aguas servidas, entre otros (Márquez y cols, 2007).

El valor medio para los sedimentos es de 21,4 mg/Kg para el PT y de 43,2 mg/Kg para el NT, se encuentran por debajo de valores reportados por Kruk y cols. (2006) para la Laguna del Diario impactada por la contaminación de la napa freática por pozos negros. La concentración de NT en los sedimentos es baja, al igual que ocurre en las muestras de agua del humedal. La liberación de fósforo aumenta con la anaerobiosis, en presencia de bacterias como *Pseudomonas* y otros grupos que varían de acuerdo a las características del sedimento. La densidad es baja en sedimentos arenosos mezclados con cantidades moderadas de materia orgánica, limo y grava como los del humedal de Playa Penino. Un exceso de N y/o P nos puede indicar un exceso de nutrientes, o una falta de asimilación de ellos (De Azevedo y Da Matta, 2004; Newman y Clements, 2008). Probablemente los procesos de nitrificación del amonio no ocurren o se dan en forma muy lenta, es decir, la tasa de mineralización excede a la de nitrificación. Esto suele ocurrir en condiciones anóxicas (Sales, 2008). La liberación del fósforo desde el sedimento, es el resultado de la compleja interacción entre procesos bióticos y abióticos que se dan entre el agua y el sedimento, regulado por variables ambientales como temperatura, pH, oxígeno disuelto, mineralización de la materia orgánica, etc. (Nowlin y cols, 2005).

El valor medio anual de PT para las muestras de suelo es de 28,5 mg/Kg (28,5 µg/L) y 45 mg/Kg para el NT. El valor de NT está por debajo del rango nitrógeno total para suelos del Uruguay, probablemente por la alta erosión que ocurre en suelos arenosos como los de Playa Penino. De acuerdo a la bibliografía para muestras de suelo, la relación entre el nitrógeno y el fósforo es de 16:1 (Ferrando, 2012). Según los resultados de este trabajo hay una concentración de nitrógeno diez veces menor (por lo cual el nutriente limitante sería el nitrógeno) o una concentración de fósforo diez veces mayor a la que debería existir para mantener dicha relación. Cabe destacar, que el proceso de extracción de arena que provoca la eliminación de la vegetación del humedal, genera aún mayor erosión por efecto de las inundaciones y el viento.

El nitrógeno y el fósforo son esenciales para todos los organismos vivos, constituyen parte fundamental de las moléculas como proteínas y ácidos nucleicos y nutrientes indispensables en el crecimiento de organismos. En el agua, los compuestos del nitrógeno y del fósforo representan un papel muy importante puesto en el crecimiento de los organismos animales y vegetales. En condiciones normales estos compuestos provienen fundamentalmente de aportes naturales externos así como de la degradación de la materia orgánica muerta (reciclaje), pero en condiciones del medio alteradas, los aportes adicionales proceden mayoritariamente de vertidos residuales urbanos y de ciertas instalaciones industriales, así como del uso creciente de fertilizantes y pesticidas en la agricultura (De Azevedo y Da Matta, 2004; Spiro y Stigliani, 2004; Cicerone y cols, 2007). En efluentes de aguas residuales urbanas o domésticas, el nitrógeno se presenta principalmente como nitrógeno orgánico o amonio y, en una proporción inferior, como nitritos y nitratos. El nitrógeno reducido se convierte en nitrito (nitrificación por *Nitrosomonas* y *Nitrosococcus*) y posteriormente en nitrato (por *Nitrobacter*) todo ello en presencia de oxígeno. Luego, mediante una reacción de descomposición anaerobia de la materia orgánica (desnitrificación) en la que se “extrae” el oxígeno de los nitratos, se produce nitrógeno gas, que es eliminado a la atmósfera (De Azevedo y Da Matta, 2004; Cicerone y cols, 2007; Newman y Clements, 2008).

El aumento de la producción de biomasa conlleva una gran acumulación de material orgánico en las capas más profundas. La degradación de la materia orgánica provoca condiciones de hipoxia o anoxia en el sedimento y en las capas más profundas de un ambiente lacustre. La descomposición anaeróbica genera gases (sulfuro de hidrógeno, metano) causantes de los malos olores, como los que describen los habitantes de la zona de Playa Penino. Además, la menor concentración de oxígeno, el incremento de amonio y amoníaco y la menor transparencia modifican drásticamente la comunidad de peces (De Azevedo y Da Matta, 2004; Cicerone y cols, 2007).

En agua dulce, es generalmente la fuente del fósforo la que regula la producción de algas y de otras plantas; pero en algunos casos, la fuente del nitrógeno es el factor dominante. El cociente entre nitrógeno y fósforo se usa como indicador para saber qué nutriente es el factor limitante, y si está ocurriendo fijación de nitrógeno (incluyendo la fijación por cianobacterias). De acuerdo a la Agencia de Protección Ambiental Sueca (Swedish Environmental Protection Agency, EPA)

la relación NT/PT < 5 obtenida en este estudio, muestra una deficiencia de nitrógeno alta.

Los valores de pH registrados en todos los muestreos oscilaron entre 5.4 y 6.0. El rango de 5.1 – 5.5 se considera fuertemente ácido y el de 5.6 – 6.0, moderadamente ácido. Por tanto, el agua del humedal varía entre esos dos estados en relación al pH. La acidez del agua tiene una gran influencia en organismos acuáticos, puesto que afecta el equilibrio de sustancias químicas, así como intercambios de esas sustancias entre los hábitats de los organismos y el ambiente circundante. La acidez también tiene efectos biológicos indirectos, con su influencia en la forma química principalmente de iones metálicos traza. El aluminio, por ejemplo, forma compuestos tóxicos bajo condiciones ácidas. En general, la acidificación conduce a una disminución en el número de plantas acuáticas y de especies animales. Los organismos bentónicos ácido-sensibles, tales como caracoles y bivalvos, comienzan a disminuir en número tan pronto como los valores de pH caen a 6. A valores de pH más bajos, las especies sensibles de peces comienzan a desaparecer; y los lagos con valores de pH alrededor de 4.5 pueden carecer totalmente de peces. La contaminación y otros factores han conducido al aumento de acidez en muchos lagos y arroyos sensibles (Swedish EPA).

En la mayoría de los ambientes acuáticos en las áreas ricas en oxígeno predominan las cianobacterias y las algas. En las áreas anóxicas, predominan las bacterias quimiotróficas. Aunque el oxígeno es uno de los gases predominantes en la atmósfera (21%), tiene solubilidad limitada en el agua y en grandes masas de aguas su intercambio con la atmósfera es bajo. La producción fotosintética de oxígeno ocurre solo en las capas superficiales de esas masas de agua. La materia orgánica se descompone por microorganismos facultativos y en las zonas más profundas por bacterias anaeróbicas. Sin embargo, el agua de las capas superficiales y profundas se renueva (de óxidas a anóxicas y viceversa), debido al “turn over” del agua debido a los cambios en la temperatura a lo largo de las estaciones. Las bacterias aerobias son todas las bacterias heterótrofas, aerobias o anaerobias facultativas, mesófilas (crecen a temperaturas moderadas) y psicotróficas (crecen a bajas temperaturas) capaces de crecer en un medio de agar nutritivo (Apella y Araújo, 2005).

La gran sensibilidad de las bacterias aerobias mesófilas a los agentes de cloración, las ubica como indicadoras de la eficacia del tratamiento de potabilización del agua. Las bacterias coliformes habitan el tracto intestinal de

mamíferos y aves, y se caracterizan por su capacidad de fermentar lactosa a 35°C. Los géneros que componen este grupo son *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Edwardsiella*. Todas pueden existir como saprofitas independientemente, o como microorganismos intestinales, excepto el género *Escherichia* cuyo origen es sólo fecal. Esto ha llevado a distinguir entre coliformes totales (grupo que incluye a todos los coliformes de cualquier origen) y coliformes fecales (término que designa a los coliformes de origen exclusivamente intestinal) con capacidad de fermentar lactosa también a 44 °C. La existencia de una contaminación microbiológica de origen fecal se restringe a la presencia de coliformes fecales, mientras que la presencia de coliformes totales que se desarrollan a 35°C, sólo indica existencia de contaminación, sin asegurar su origen (Apella y Araújo, 2005).

Si bien el amplio grupo de bacterias coliformes, se originan en el tracto intestinal de animales de sangre caliente y pueden encontrarse en sus desechos, también pueden hallarse asociadas al suelo y la vegetación. La mayoría de las especies no son patógenas, sin embargo continúan siendo indicadores aceptables de contaminación de origen animal y de la calidad del tratamiento de agua para consumo humano (Apella y Araújo, 2005; Oran, 2012).

Cabe destacar, que la capacidad de los coliformes fecales de reproducirse fuera del intestino de los animales homeotérmicos es favorecida por la existencia de condiciones adecuadas de materia orgánica, pH, humedad. Desde hace mucho tiempo se han utilizado como indicador ideal de contaminación fecal. Su presencia se interpreta como una indicación de que los organismos patógenos pueden estar presentes y su ausencia indica que el agua o el alimento estudiado se hallan exentos de organismos productores de enfermedades (Apella y Araújo, 2005; Oran, 2012)

El Decreto 253/79 establece un límite de una media de 1000 ufc/100 ml para coliformes fecales en aguas clase 3 (*“Aguas destinadas a la preservación de los peces en general y de otros integrantes de la flora y fauna hídrica, o también aguas destinadas al riego de cultivos cuyo producto no se consume en forma natural o en aquellos casos que siendo consumidos en forma natural se apliquen sistemas de riego que no provocan el mojado del producto”*) y de entre 500 y 1000 ufc/100 ml en aguas clase 2 (*“Aguas destinadas al riego de hortalizas o plantas frutícolas u otros cultivos destinados al consumo humano en su forma natural, cuando éstas son usadas a través de sistemas de riego que provocan el mojado del producto. Aguas destinadas a recreación por contacto directo con el cuerpo humano”*). Los niveles de contaminación bacteriológica hallados, se encuentran por encima de

los niveles guía para este tipo de aguas, así como para fuentes de agua potable de diferentes organizaciones nacionales e internacionales, representando también un riesgo para el uso recreativo del agua. Oliva y Pérez (2005), analizaron muestras de aguas del lago de Izabal y de Río Dulce, en Guatemala, hallando valores de fecales inferiores a los encontrados en este trabajo (lago Izabal 454 ufc/100 ml y Río Dulce 62 ufc/ 100 ml). Ambos autores destacan el peligro sanitario que representa esta situación para la población de las comunidades en sus márgenes, que están en contacto con el agua. Esta situación se da también el humedal de Playa Penino que además, es utilizado para riego, pesca y usos recreativos por la población. Los niveles de contaminación, tanto fisicoquímicos como bacteriológicos representan un riesgo alto para la salud humana, además de limitar el recurso piscícola como fuente de alimentación en comunidades donde los niveles de pobreza son importantes. Los valores encontrados en este estudio son similares (mayo) o superiores (octubre y febrero) a los de varias estaciones del río Traiguén IX Región en Chile (540 ufc/ml; 1100 ufc/ml; 920 ufc/ml) (Rivera y cols, 2009).

El análisis de correlaciones múltiples indica que hay una asociación significativa entre la concentración de amonio y la presencia de enterobacterias con el daño genético registrado en las muestras provenientes de *Ctenomys*, así como en los ensayos *in vitro*, realizados en el *Allium* test. Dichos resultados están en concordancia con un impacto negativo revelado por los marcadores de daño genético, de la descarga de efluentes cloacales en la zona del humedal de Playa Penino.

El MDS confirma los resultados de las correlaciones múltiples, ya que vuelven a vincularse en la Dimensión 1, los marcadores de daño genético agudo analizados *in situ* e *in vitro*, con la concentración de enterobacterias y de amonio. Cabe destacar sin embargo, que la inhibición del crecimiento de las células meristemáticas de *Allium* que reflejan fenómenos de carácter citotóxico, se hallan vinculadas a las concentraciones de P, N y nitratos. Habría que confirmar dicho hallazgo, con un muestreo más exhaustivo de agua superficial y nuevos ensayos de inhibición mediante el test de *Allium*.

Sin embargo, es importante destacar que existe un componente de la inhibición del crecimiento de los meristemas vinculados al amonio y a la presencia de enterobacterias como la indica el MDS en la dimensión 2. El hecho de que se agrupen los marcadores de daño genético crónico (% MN en *Ctenomys* y en *Allium*,

en los ensayos *in situ* e *in vitro*, respectivamente), con el resto de las variables ambientales (concentración de NT y PT en agua y sedimento y concentración de nitrato en agua) indica que podría haber un efecto de genotoxicidad crónica debido a dichas variables, lo que habría que confirmar con muestreos más exhaustivos.

En cuanto a la asociación de las variables que miden daño genético con la concentración de amonio y fósforo en el agua cabe señalar, que altas concentraciones de fósforo y de amonio, pueden ser indicadores de contaminación de origen cloacal. El amonio en particular, inhibe la fijación simbiótica del nitrógeno (que es una entrada de nitrógeno muy importante en los ecosistemas terrestres además de la escorrentía) por parte de los microorganismos asociados a especies vegetales, que en el ambiente del humedal está en estrecho contacto con el agua. Este proceso se produce de forma indirecta por un incremento en la concentración citoplasmática de amonio en las raíces, excediendo la capacidad asimilativa de las mismas (Newman y Clements, 2008). El amonio también puede inhibir la nodulación reprimiendo los genes Nod (Marschner, 2003). Cuando las bacterias descomponen materia orgánica se libera mayor cantidad de amonio, proceso que depende entre otros factores de la proporción de carbono y nitrógeno en el sustrato (Marschner, 2003).

En medio acuoso, la presencia del nitrógeno amoniacal está regulada por un equilibrio químico que determina la coexistencia de dos formas: una forma no ionizada, el amoníaco (NH_3), y una forma ionizada, el ion amonio (NH_4^+). Las proporciones relativas de cada una de ellas, está condicionada por diversas variables, entre las que se destacan el pH, la temperatura y la fuerza iónica. La concentración de amoníaco aumenta con el incremento del pH y de la temperatura y decrece con el aumento de la fuerza iónica, el ion amonio predomina con valores de pH inferiores a 7 (Pepe y Lombardi, 2003). La toxicidad del amonio para los organismos se relaciona con la forma no ionizada (amoníaco), debido principalmente a su elevada solubilidad en lípidos, lo que facilita su paso a través de las membranas biológicas, causando daños en las superficies respiratorias. En los peces por ejemplo, las partes distales de las aletas se tornan blancas o transparentes, perdiendo su color original. Las sales de amonio producen secreciones de la piel y destrucción branquial (Pepe y Lombardi, 2003; Spiro y Stigliani, 2004). Con un pH menor de 6,6, como es el caso de los registros para el humedal de Playa Penino, se interrumpe la nitrificación, o sea que el amonio no puede ser transformado por las bacterias *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Pseudomonas* y otras en nitritos y nitratos. Los

compuestos nitrogenados (amonio y nitratos) se transforman en nitritos en el aparato digestivo de los mamíferos por acción microbiana, cuyo exceso genera la formación de metahemoglobina. Dicho compuesto, disminuye el transporte de oxígeno bloqueando su transporte por la hemoglobina. Sumado a esto, estos compuestos nitrogenados (nitratos y nitritos) ingeridos en el agua, pueden transformarse en nitrosaminas (se forman cuando un nitrógeno (N) y un oxígeno (O) de un compuesto “nitrosante” (nitratos y nitritos) se unen al nitrógeno del grupo amino⁸ (N) de un compuesto amínico), cuyo potencial teratogénico y carcinogénico es reconocido (Jensen, 2003; Camargo y Alonso, 2006). Aproximadamente el 90% de las 300 nitrosaminas ensayadas han demostrado efectos cancerígenos en animales de laboratorio. Se han estudiado aproximadamente 40 especies animales, entre ellas mamíferos, aves, peces y anfibios, y ninguna de ellas ha mostrado resistencia al efecto mutagénico de estos compuestos (OIT, 1998).

En el ecosistema, los nitratos una vez incorporados al agua y solubilizados son difícilmente removibles en forma natural (considerando una fuente de agua con oxígeno disuelto y sin carbono orgánico disponible) y muy costosos de eliminar por medios artificiales (resinas de intercambio iónico u ósmosis inversa) (Pepe y Lombardi, 2003). Hernández-Reyes y cols (2012) afirman que las microalgas como *Chlorella* y *Scenedesmus* (organismos autótrofos que ocupan el primer eslabón en la cadena trófica) en las regiones tropicales y subtropicales, se emplean como un biosistema alternativo para la remoción de nutrientes de este tipo de aguas. Estos microorganismos incorporan nitrógeno en forma de amonio que es utilizado para formar aminoácidos; aunque tienen la capacidad de incorporarlo en forma de nitrato. En aguas limitadas en luz los grupos de algas móviles como los dinoflagelados y criptomonadales son capaces de migrar cerca de la superficie para asegurar el acceso a la energía de la luz necesaria para reducir el nitrato a amonio, lo cual es un punto crítico para incorporar esta forma oxidada de N dentro de las vías de biosíntesis y crecer. En contraste, los organismos no móviles deben enfrentar las condiciones de profundidad y poca irradiación, limitando la captación de nitrato y captando amonio. También existen diferencias fisiológicas intrínsecas

⁸ Se pueden considerar a las aminas como compuestos nitrogenados derivados del amoníaco (NH₃) en el que uno o más grupos alquilo están unidos al nitrógeno. Los grupos alquilo sólo contienen átomos de carbono e hidrógeno y siempre forman parte de una molécula mayor.

en la captación de N por diferentes tasas de algas y esto puede conducir a una respuesta contrastante a las diferentes fuentes de N (Swackhamer y cols, 2004).

El impacto negativo de los asentamientos irregulares ubicados en las inmediaciones del humedal de Playa Penino, así como la falta de planes de saneamiento probablemente están provocando una elevación en los valores de nutrientes por encima de los máximos admitidos por la normativa nacional e internacional vigente, provocando alteraciones en los ciclos de los nutrientes.

Finalmente cabe destacar, que los valores obtenidos para micronutrientes y oligoelementos en sedimento anualizados (sodio, calcio, hierro) en las muestras fueron las siguientes: sodio (38,5 mg/Kg), calcio (770 mg/Kg), magnesio (180 mg/Kg) y potasio (240 mg/Kg), cobre (1,2 mg/Kg), zinc (2,9 mg/Kg), manganeso (18,5 mg/Kg), hierro (1500 mg/Kg). Todos los valores son normales de acuerdo a los estándares para sedimento que figuran en la API (American Petroleum Intitute) y muy bajas para el zinc (<50) y el cobre (<15) (Sales, 2008).

Ctenomys pearsoni como centinela

Las especies centinela se utilizan para detectar a tiempo situaciones de potencial peligro, permitiendo evaluar la presencia y acción de contaminantes en el medio en el que viven. Se entiende que los resultados obtenidos con estas especies son hasta cierto punto, extrapolables a la especie humana (Alonso y Tabor, 2004; Den Besten y Munawar, 2005; Bischoff y cols, 2010; Fernández-Tajes y cols, 2011).

Los datos obtenidos muestran que *Ctenomys pearsoni*, resulta ser un centinela ambiental adecuado. La extensión del daño genético medido a través de las variables TMO y % de ADN en la cola del cometa, en el ensayo de electroforesis de células individuales reveló exposición aguda y reciente a xenobióticos que, en este caso se pueden relacionar con la descarga de efluentes domésticos. El test de MN reveló además, exposición crónica reciente, con daño genético provocado por eventos clastogénicos o aneugénicos (Mudry y Carballo, 2006). El *Allium* test confirma estos datos, revelando la presencia de sustancias genotóxicas (que provocan puentes anafásicos y telofásicos así como MN) y citotóxicas, dada la alteración del huso mitótico que determina la presencia de cromosomas rezagados durante la división celular, del mismo modo que la disminución del índice mitótico

(ya sea por alteración del huso o por muerte celular) (Mudry y Carballo, 2006; Monte y cols, 2007; Dragoeva y cols, 2009).

El desequilibrio químico así como el nivel de eutrofización del humedal de Playa Penino, impacta directamente sobre el genoma de estos organismos que viven en cuevas, en contacto directo con el suelo y que construyen sus madrigueras, en esta área, en la proximidad inmediata al agua del humedal y la cañada. La vegetación que consumen se encuentra asociada al humedal, absorbiendo el agua y los contaminantes que esta presenta, especialmente en aquellas especies con mayor contenido de agua (*Equisetum sp.*, *Cynodon dactylon* y *Paspalum nicorae*).

Tomando en cuenta todos los datos discutidos, se vuelve imprescindible para mantener la integridad ecosistémica del humedal de Playa Penino así como la preservación de la salud humana el acceso a la conexión al agua potable, la estricta vigilancia y control de pozos sépticos, y el diseño de sistemas de saneamiento adecuados. La regularización de los asentamientos a través de un plan de vivienda que contemple las posibilidades socio-económicas de los pobladores, contribuiría a la disminución de la carga de contaminantes por aguas servidas.

El restablecimiento de los equilibrios físico-químicos entre los compartimentos suelo, agua y sedimento, también se beneficiarán evitando la extracción de arena para construcción ya descrita en el informe GeoUruguay (Martino y cols, 2008).

Bibliografía

Aldabe, J.; Mejía, P. y Morena, V. (2009). Propuesta de proyecto de selección y delimitación del área Humedales del Santa Lucía para su ingreso al Sistema Nacional de Áreas Protegidas. MVOTMA. Uruguay.

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

Andersen, J. (1996). An ignition method for the determination of total phosphorus in lake sediments. *Water Res.* 10: 329-331.

APHA; AWWA; WPCF. (1995). Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Ed Díaz Santos SA. Barcelona.

Arballo, E. (1996). Playa Penino y las aves migratorias. Ed. Barreiro y Ramos. Montevideo, Uruguay.

Arballo E. y Bresso, A. (2007). Reserva Natural Playa Penino. Fondo de las Américas, Intendencia Municipal de San José, DINAMA. Uruguay. 95 pp.

Arocena, R.; Chalar, G.; Fabián, D.; de León, L.; Brugnoli, E.; Silva, M.; Rodó, E.; Machado, I.; Pacheco, J.; Castigioni, R. y Gabito, L. (2008). Evaluación ecológica de aguas y biomonitorio. DINAMA, S. Limnología, Facultad de Ciencias. Pp.24.

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

Camargo, J. y Alonso, A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International* 32: 831–849.

Cano, M.; Peña, J. y Gonzales-Figueroa, H. (2002). Alteraciones de los índices de fases y mitótico en meristemas de *Allium cepa*, inducidas por extractos de *Lepidium meyenii walp* “Maca”. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Ricardo Palma*. 3 (1): 21-22.

Capriglione, T.; De Iorio, S.; Gay F.; Capaldo A.; Vaccaro M.; Morescalchi M. y 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.

Cicerone, D.; Sánchez-Proañó, P. y Reich, S. (2007). Contaminación y medioambiente. Ed. Eudeba. ISBN 978-950-23-1489-1. Argentina. Pp. 203.

Chakraborty, R.; Mukherjee, A. y 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.

Chalar, G.; Arocena, R.; Pacheco, J. y Fabián, D. (2011). Trophic assessment of streams in Uruguay: A Trophic State Index for Benthic Invertebrates (TSI-BI). *Ecological Indicators*. 11: 362–369.

Clemente, B.; Devaux, A.; Perrodin, Y.; Danjean, M. y Ghidini-fatus, M. (2004). Assessment of Sediment Ecotoxicity and Genotoxicity in Freshwater Laboratory Microcosms. *Ecotoxicology*, 12: 323–333.

CMA-JA (CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE DE LA JUNTA DE ANDALUCÍA). (1999). “Los criterios y estándares para declarar un suelo contaminado en Andalucía y la metodología y técnicas de toma de muestra y análisis para su investigación”. España. Pp. 257.

Conde, D.; Gorga, J. y Chalar, G. (1999). Nitrógeno, Fósforo y Sílice. Cap. 11. En *Métodos en ecología de aguas continentales*. Ed. Arocena & Conde. DIRAC. Montevideo. Pp.233.

da Silva, J.; Freitas, T.; Heuser, V.; Marinho, J. y Erdtmann, B. (2000). Genotoxicity Biomonitoring in Coal Regions Using Wild Rodent *Ctenomys torquatus* by Comet Assay and Micronucleus Test. *Environ Mol Mutag*. 35:270–278.

De Azevedo, F. y Da Matta, A. (2004). As bases toxicológicas da ecotoxicologia. Intertox. RIMA. Brasil. ISBN 85-89843-01-7. Pp. 322. DINAMA-JICA (La Agencia de Cooperación Internacional de Japón). La protección de los Recursos Hídricos en la Cuenca del Río Santa Lucía. ANEXO (8.4.4). www.dinama.gub.uy

den Besten, .J. y Munawar, M. (2005). *Ecotoxicological testing of marine and freshwater ecosystems: emerging techniques, trends, and strategies*. Published by CRC PressTaylor & Francis Group. Pp. 195-228.

Dragoeva, A.; Kalcheva, V. y Stoicho, S. (2009). Genotoxicity of agricultural soils after one year of conversion period and under conventional agriculture. *Journ. Applied Sci. Environ. Manag*. 13 (1): 81-83.

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

FAO (Food and Agriculture Organization), (1997). Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos. ISBN 92-5-303875-6.

Fenech M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. 2 (5): 1084-1104.

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

Ferrando, M. (2012). Curso de Fertilidad del Suelo. Fósforo. http://www.fagro.edu.uy/~fertilidad/curso/docs/Fosforo_impr.pdf

Fiskesjö, G. (1988). The *Allium* test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research*, 197 (1988) 243-260.

FREEPLATA (2005). Análisis diagnóstico transfronterizo del Río de la Plata y su frente marítimo. Proyecto: Protección ambiental del Río de la Plata y su frente marítimo: Prevención y control de la contaminación y restauración de hábitats. PNUD/GEF. RLA/99/G31. Pp.311.

Garriott, M.; Phelps, J. y Hoffman, W. (2002). A protocol for the in vitro micronucleus test. I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutat Res*. 517: 123-134.

Gutiérrez, S. (2000). Eutrofización en Embalses, en Ambiente Ecológico, <http://www.ambienteecologico.com/ediciones/072-07-2000/072-silvinagutierrez.html>

Hernández B; Rodríguez M.; Lozano C. y Castilla P. (2012). Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libres e inmovilizados. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*. 3 (1): 80-94.

Heuser, V.; da Silva, J.; Moriske, H.; Dias, J.; Yoneama, M. y Freitas, T. (2002). Genotoxicity Biomonitoring in Regions Exposed to Vehicle Emissions Using the Comet Assay and the Micronucleus Test in Native Rodent *Ctenomys minutus*. *Environ Mol Mutag*. 40:227–235.

ITU (Plan de Actividades del Instituto de Teoría y Urbanismo (ITU) de la Facultad de Arquitectura). (2001). Modos de gestión y producción de suelo metropolitano. Definición y caracterización del borde urbano en tres corredores metropolitanos de Montevideo. http://www.farq.edu.uy/estructura/servicios_docentes/institutos/itu/InvAplicada/Gestion/Capitulo2/txtgestion.htm

Kopjar, N.; Mustafic, P.; Zanella, D.; Buj, I.; Caleta, M.; Marcic, Z.; Milic, M.; Zdravko, D. y Mrakovcic, M. (2008). Assessment of DNA integrity in erythrocytes of *Cobitis elongate* affected by water pollution: the alkaline comet assay study. *Folia Zool*. 57(1–2): 120–130.

Kruk, C.; Rodríguez-Gallego, L.; Quintans, F.; Lacerot, G.; Scasso, F.; Mazzeo, N.; Meerhoff, M. y Paggi, J. (2006). Biodiversidad y calidad de agua de 18 pequeñas lagunas en la costa sureste de Uruguay. En: Menafrá, R.; Rodríguez-Gallego, L.; Scarabino, F. y Conde, D. (Org.). Bases para la conservación y el manejo de la costa Uruguaya. Montevideo, Vida Silvestre Uruguay. Pp. 599-610, ISBN: 9974758920.

Kumar, R.; Nagpure, N.; Kushwaha, B.; Srivastava, S. y Lakra, W. (2010). Investigation of the Genotoxicity of Malathion to Freshwater Teleost Fish *Channa punctatus* (Bloch), Using the Micronucleus Test and Comet Assay. *Arch Environ Contam Toxicol*. 58:123–130.

Laws, E. (1993) “Aquatic pollution: an introductory text” Copyright 1993 by John Wiley.

- Machella, N.; Battino, M.; Pisanelli, B. y 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.
- Márquez, A.; Senior, W.; Martínez, G. y González, A. (2007). Concentraciones de nitrógeno y fósforo en sedimentos recientes de la Laguna Los Patos, Estado Sucre, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr.* 46 (2): 137-145.
- Marschner, H. (2003). Mineral nutrition of higher plants. Second edition, ed. Elsevier Science Ltd. Great Britain. Pp. 889.
- Marschner, P. (2007). Plant-microbe interactions in the rhizosphere and nutrient cycling. *Nutrient cycling in terrestrial ecosystems.* 10 (1): 159-182.1
- Martínez, A.; Reyes, I. y Reyes, N. (2007). Citotoxicidad del glifosato en células mononucleares de sangre periférica humana. *Biomédica.* 27(4): 594-604.
- Martino, D.; Buonomo, M. y Villalba, C. (2008). GeoUruguay: Informe del estado del ambiente. CLAES, PNUMA, DINAMA. Montevideo, Uruguay. 350 pp.
- Mazzeo, N.; Clemente, J.; García-Rodríguez, F.; Gorga, J.; Kruk, C.; Larrea, D.; Meerhoff, M.; Quintans, F.; Rodríguez-Gallego, L. y Scasso, F. (2002). Eutrofización: Causas, consecuencias y manejo. En: *PERFIL AMBIENTAL DEL URUGUAY*. Ed. Noran. Pp. 201.
- MGAP. (2009). Sistema de Información Geográfica del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Mapa de la erosión en Uruguay. www.mgap.gub.uy.
- Mitsch W. y Gosselink J. (1986). *Wetlands*. Reinhold, NY.
- Mohanty, G.; Mohanty, J.; Nayak, A.; Mohanty, S y Dutta, S. (2011). Application of comet assay in the study of DNA damage and recovery in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings after an exposure to phorate an organophosphate pesticide. *Ecotoxicology* 20: 283–292.
- Monte, L.; Medeiros, M.; Batistuzzo, S. y Fassarella, L. (2007). Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbu river northeastern/RN Brazil. *Genetic and Molecular Biology.* 30 (2): 435-441.
- Mudry, M. y Carballo M. (2006). *Genética Toxicológica*. Ed. De los 4 Vientos. Pp. 669. ISBN -13: 978-987-564-563-9. Argentina.
- Newman, M. y Clements, W. (2008). *Ecotoxicology: a comprehensive treatment*. CRC Press. Pp. 852.
- Norppa, H. y Falck, G. (2003). What do human micronuclei contain? *Mutagenesis.* 18: 221-233.
- Nowlin, W.; Evarts, J. y Vanni, M. (2004). Release rates and potential fates of nitrogen and phosphorous from sediments in eutrophic reservoir. *Freshwater Biology.* 50: 301-322.
- OIT (Organización Internacional del Trabajo) (1998). *Encyclopedia of Occupational Health and Safety*. Vol. IV. Ed. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Subdirección General de Publicaciones, Madrid. Pp. 4230.
- Parolini, M.; Binelli, A. y Provini, A. 2011. Assessment of the Potential Cyto–Genotoxicity of the Nonsteroidal Antiinflammatory Drug (NSAID) Diclofenac on the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*). *Water Air Soil Pollut.* 217:589–601.
- Pellejero, S.; Martínez, J.; Fernández, A. y Martínez, H. (2006) .Conservación de Humedales de Santa Lucía. Pp. 18 <http://www.uruguaypiensa.org.uy/05quintopremio.htm>

- Pepe, U. y Lombardi, M. (2003). Tratamiento alternativo de efluentes cloacales individuales. 13° Congreso Argentino de saneamiento y medioambiente. Buenos Aires, Argentina. Pp. 31, <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/argentina13/cong27.pdf>
- Rico-Rodríguez, M.; Sánchez-Pérez, A. y Quezada, J. (2004). Evaluación genotóxica de efluentes urbano-industriales en peces nativos e introducidos en la cuenca del río San Juan. *Red Ambiental*. 5: 1-8.
- Ribeiro, L.; Salvadori, D. y Marques, E. (2003). *Mutagenese Ambiental*. Ed. ULBRA. Brasil. Pp. 356.
- Rocha, G. (1999). Playa Penino y la conservación de los hábitats costeros del Uruguay. *Cotinga* 11: p 68-70.
- Rodríguez, A.; Arpajón, Y.; Castaño, Z.; Marsán, R.; Lugo, D.; Roevros, N.; Chou, L.; Rojas, N. y Heydrich, M. (2006). Análisis de contaminantes inorgánicos tóxicos en las aguas del río Almendares, Cuba. ENMA, CONYMA. Pp. 1-11.
- Salas, H. (1996). Curso de eutrofización en lagos cálidos tropicales. Marco conceptual de eutrofización. OPS/CEPIS/96.22 (CPA). Pp. 13.
- Sales, M. (2008). Transferencia de nutrientes entre la columna de agua y el sedimento bajo condiciones anaerobias en el embalse de Beniarrés (Alicante). Tesis de maestría. Pp. 150.
- SNAP (Sistema Nacional de Áreas Protegidas, DINAMA) (2006). Guía de Educación Ambiental. Humedales del Santa Lucía.
- Spiro, T. y Stigliani, W. (2004). *Química medioambiental*. Ed. Pearson. 2ª ed. Pp. 520.
- Sushila, P.; Alok, K.; Pandey, M.; Parmar, D. y Dhawan, A. (2006). Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: Evidence from the comet assay. *Mutation Research*. 607: 176-183.
- Swackhamer, D.; Paerl, H.; Eisenreich, S.; Hurley, J.; Hornbuckle, K.; McLachlan, M.; Mount, D.; Mur, D. y Schindler, D. (2004). Impacto de Contaminantes Atmosféricos Sobre Ecosistemas Acuáticos. *Tópicos en Ecología*. Sociedad Americana de Ecología. 12: 1-30. ISSN 1092-8987
- Unidad de Cambio Climático (UCC, MVOTMA). (2004). Programa de Medidas Generales de Mitigación y Adaptación al Cambio Climático en Uruguay (PMEGEMA). Proyecto URU/00/G31 (Proyecto del Fondo para el Medioambiente Mundial, PNUD). Uruguay.
- Urdiales, C. (2006). Propuesta de delimitación y zonificación de futuras áreas protegidas en el Río Santa Lucía y Esteros de Farrapos e islas del río Uruguay.
- Valderrama, J. (1981). The simultaneous analysis of total Nitrogen and total Phosphorus in natural waters. *Mar Chem*. 10: 109-122.
- Yin X.; Zhu G.; Li X. y Liu S. (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.
- Zalacain, M.; Sierrasesúmaga, L. y Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. Revisión. *Anales@cfnavarra.es*. Vol. 28. N° 2.
- Zar, J. (2010). *Biostatistical Analysis*. Fifth Ed. Pearson Education. London. Pp. 944. ISBN: 978-0-13-100846-5

SECCIÓN IB: Gradiente de impacto de efluentes domésticos en Playa Penino

En 1996, la Intendencia Municipal de San José declaró, a través de la resolución N° 774/996 a Playa Penino como Playa Ecológica (Aldabe y cols, 2009). A pesar de ello, esta zona se ha deteriorado en forma paulatina por varias causas entre las que se cuentan la contaminación por aguas servidas y la deposición de desechos sólidos (Figura 1).



Figura 1. Reserva Natural Playa Penino. Fotografía de uno de los basurales ubicado junto al humedal mayor de la reserva

La zona de estudio se ubica en el humedal más extenso del área ecológica Playa Penino, al sur de la ruta 1, a la altura del kilómetro 30. De dicho humedal nace una cañada poco profunda rodeada de vegetación. Muchos de los desagües de las viviendas van directamente a canaletas que por lixiviado o escorrentía terminan en el humedal. Los pobladores cuyas viviendas están regularizadas, cuentan con pozos negros en su mayoría filtrantes (Figura 2) (Pellejero y cols, 2006).



Figura 2. Se aprecian las CANALETAS rodeando a las viviendas

Las conexiones a la red de la empresa Obras Sanitarias del Estado (OSE) es mínima por su alto costo, lo que implica que el agua para consumo, higiene personal y doméstica, riego y otros usos, se obtiene de pozos, muchos de ellos se observan ubicados muy próximos a letrinas y sin tener en cuenta el declive del terreno. Cabe destacar que aunque la barométrica se vacía en el vertedero municipal, que se encuentra a un kilómetro y medio de la entrada de Delta del Tigre, ocurren vaciamientos ilegales (Figura 3) (Pellejero y cols, 2006).



Figura 3. Vaciamiento de camiones de barométrica

En dicha zona se encuentra parte del acuífero Raigón, de fundamental importancia para nuestro país, cuya profundidad es menor a los 40 metros y es única fuente de abastecimiento para más de 15.000 personas (incluyendo centros poblados, industrias y establecimientos rurales) (Martino y cols, 2008). Sumado a

esto, el humedal de Playa Penino es utilizado para actividades de pesca y recreación (baños principalmente de la población juvenil e infantil).

Los ejemplares de *Ctenomys pearsoni* (Figura 4) para esta los análisis de esta Sección, fueron colectados en las zonas que se indican con puntos blancos⁹ en áreas denominadas: CANALETA (corresponden a muestras tomadas sobre individuos que habitan cuevas ubicadas sobre canaletas que bordean las áreas habitadas-13 individuos), CAÑADA (es un pequeño curso de agua rodeado de vegetación-10 individuos), HUMEDAL (orillas del espejo de agua mayor-18 individuos).

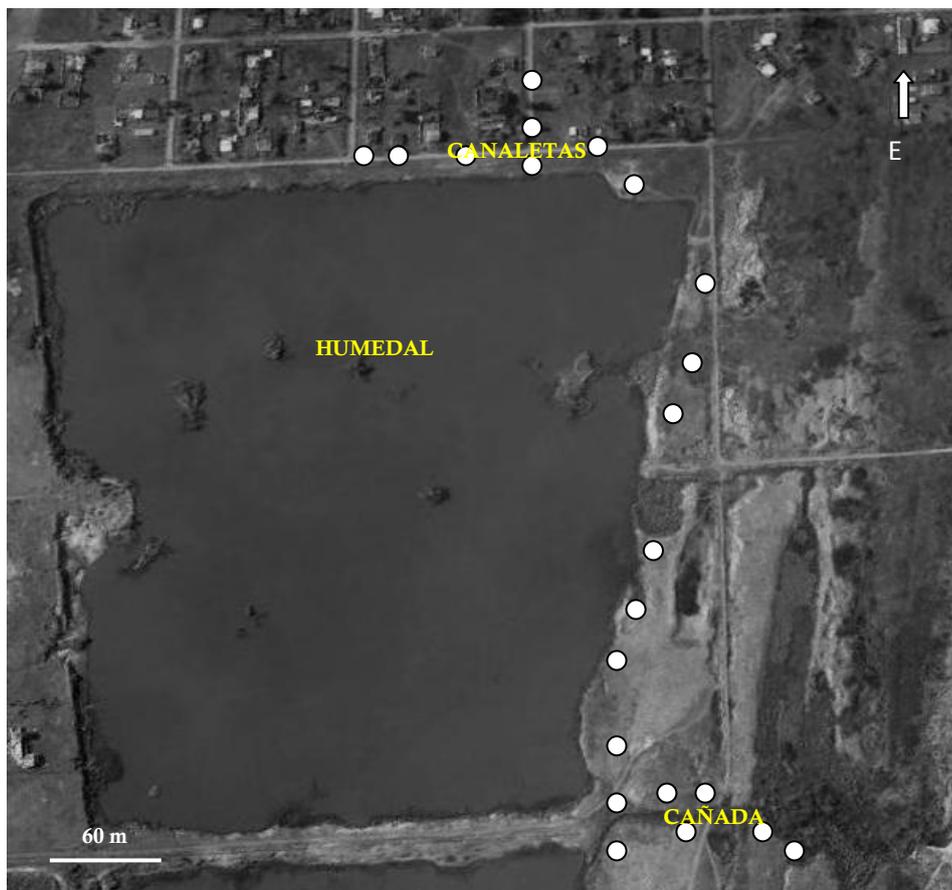


Figura 4. Humedal de Playa Ecológica Penino. Los puntos en blanco indican áreas, en donde se concentró la captura de ejemplares y donde se tomaron las muestras de agua, sedimento y suelo para constituir las muestras compuestas. (Imagen modificada de Google Earth).

Todas las muestras que se utilizaron son de tipo “compuesto”, es decir, que son el resultado de una mezcla de muestras tomadas en varios puntos, representativos de cada ambiente (en diez CANALETAS, seis puntos a lo largo de la CAÑADA, veinte sobre las orillas del HUMEDAL). Dichos puntos están junto a

⁹ Los puntos blancos no corresponden a la cantidad de individuos muestreados.

las cuevas donde se capturaron los ejemplares de *Ctenomys*. Las mismas se tomaron en el durante el mes de octubre, donde la temperatura osciló entre los 15 y los 22°C y no se registraon lluvias en los 15 días durante los que se realizó el muestreo, de forma de establecer un “gradiente” desde las CANALETAS hacia el HUMEDAL, siendo el punto de “salida” del agua hacia la Playa la CANALETA. La metodología utilizada (ensayo cometa, determinación de nutrientes y cuantificación de microorganismos mesófilos, coliformes y entrobacterias) es la misma que se detalló en la Sección I, excepto que no se realizó el test de MN, ni el *Allium* test dado que en la Sección precedente, se estableció la correlación positiva entre dicho ensayo y los resultados obtenidos sobre las muestras sanguíneas de *Ctenomys*.

Resultados

Ensayo de electroforesis en células individuales (SCGE)

En los Gráficos 1 y 2 se representan los valores medios para el % de ADN dañado y TMO correspondiente a linfocitos de los individuos colectados en cada sitio de muestreo. Los datos de las variables son normales (Kolmogorov-Smirnov) y homocedásticos (Levene). El análisis de varianza (ANOVA) revela diferencias significativas entre los tres sitios HUMEDAL, CAÑADA y CANALETA ($p < 0.01$), siendo el HUMEDAL el que presenta menores niveles de daño genético. No se constataron diferencias entre sexos por lo cual se trataron todos los individuos como un solo grupo para cada sitio. En el caso de los individuos cercanos a la CANALETA, la media del ADN dañado por célula analizada es de más del 50% y es donde se registra el mayor nivel de daño también por la variable TMO. Las diferencias de los marcadores estas variables para cada sitio son significativamente diferentes respecto al control ($p < 0.01$).

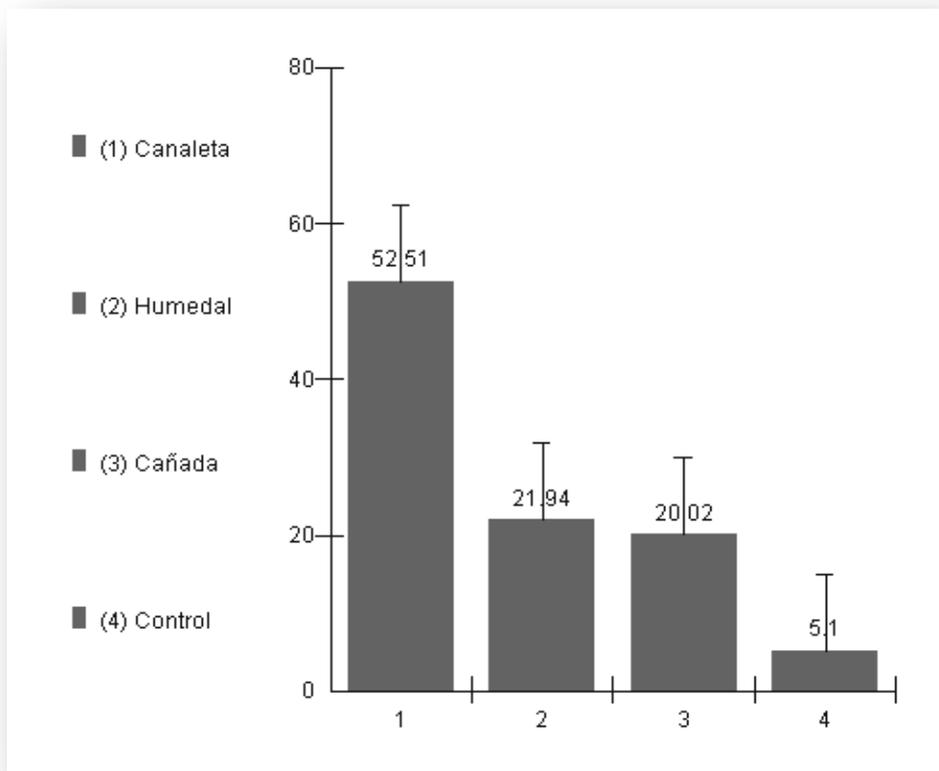


Gráfico 1. Extensión del daño genético en linfocitos de *Ctenomys*, medido por el ensayo cometa, a través de la variable % de ADN dañado comparando los 3 sitios de muestreo y el control.

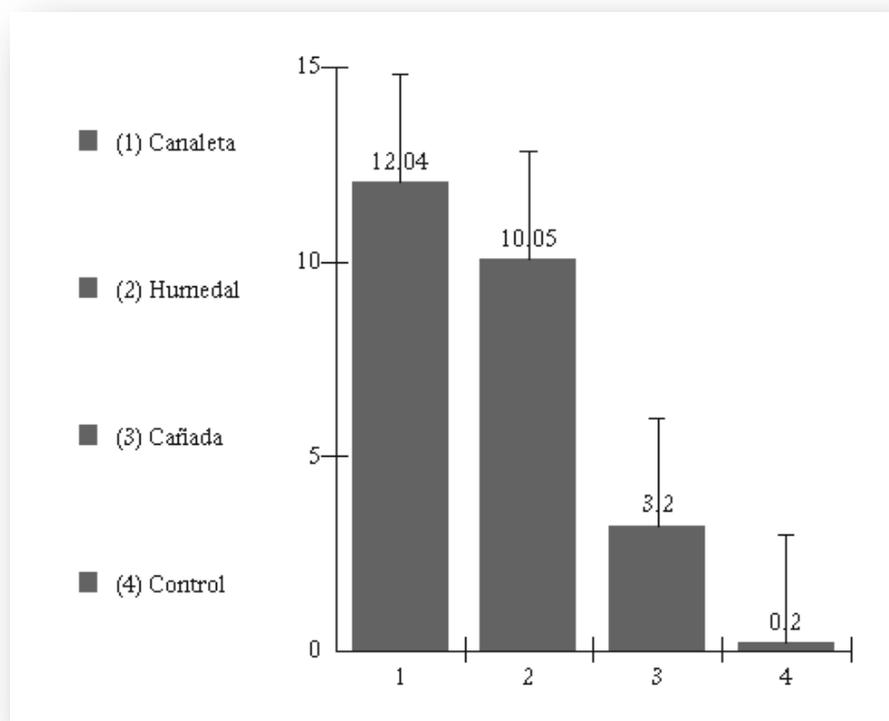


Gráfico 2. Extensión del daño genético en linfocitos de *Ctenomys*, medido por el ensayo cometa a través de la variable TMO comparando los 3 sitios de muestreo y el control.

Determinación de parámetros físico-químicos

Los resultados de los análisis de las muestras de agua muestran un pronunciado descenso del nitrógeno total (NT) en un gradiente desde las CANALETAS, hacia el HUMEDAL y la CAÑADA. Los valores de nitrato también disminuyen en ese orden. Para el resto de los parámetros; fósforo total (PT), fosfato y amonio se observa una clara disminución respecto a las muestras de las CANALETAS. El parámetro que en las muestras del HUMEDAL llegan casi al valor del sitio CANALETAS, es el amonio.

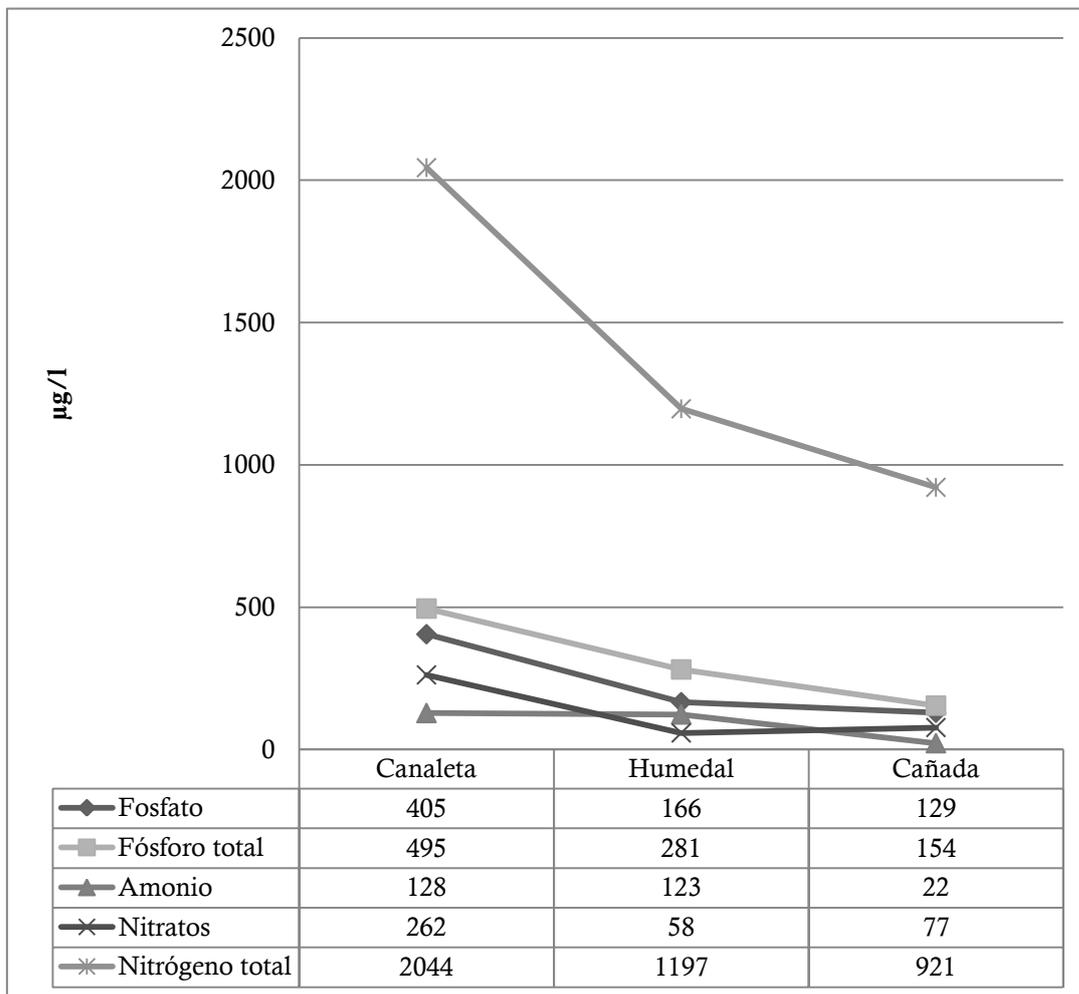


Gráfico 3. Parámetros físico-químicos de muestras compuestas de agua en los sitios denominados: CANALETA, HUMEDAL y CAÑADA

Para los parámetros PT y NT medidos en muestras de sedimento, se observa una marcada disminución desde el sitio CANALETA hacia el HUMEDAL, registrándose los menores valores en la CAÑADA.

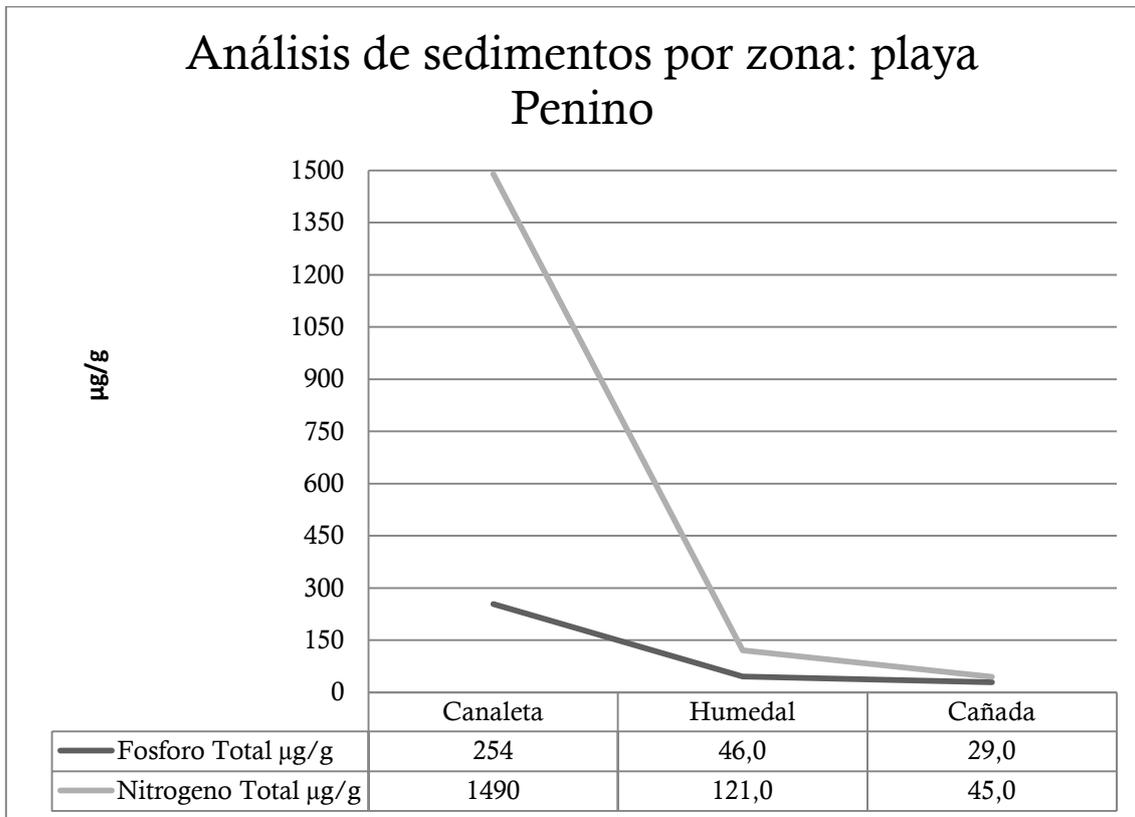


Gráfico 4. Parámetros físico-químicos de muestras compuestas de sedimento en los sitios denominados: CANALETA, HUMEDAL y CAÑADA

Parámetros microbiológicos

En el Gráfico 5 cada barra representa el total de los microorganismos analizados. En la muestra CANALETA los microorganismos mesófilos totales representan un 41%, seguidos de los coliformes totales que representan un 35%, y un alto porcentaje de enterobacterias (24%). En la muestra HUMEDAL, los microorganismos mesófilos totales tienen una abundancia cercana al 48%, seguidos de los coliformes totales (44%) y de las enterobacterias (8%). En en el HUMEDAL, mientras que en la CAÑADA llegan al 72%. En la muestra CAÑADA, aumentan los mesófilos totales (72%) y disminuyen los coliformes totales (23%) y las enterobacterias (5%). No existen diferencias significativas entre las muestras según análisis de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

En la muestra CANALETA hay 2100 ufc/100 ml, en la que corresponde a HUMEDAL hay 1600 ufc/100 ml y en la muestra CAÑADA hay 200 ufc/100 ml.

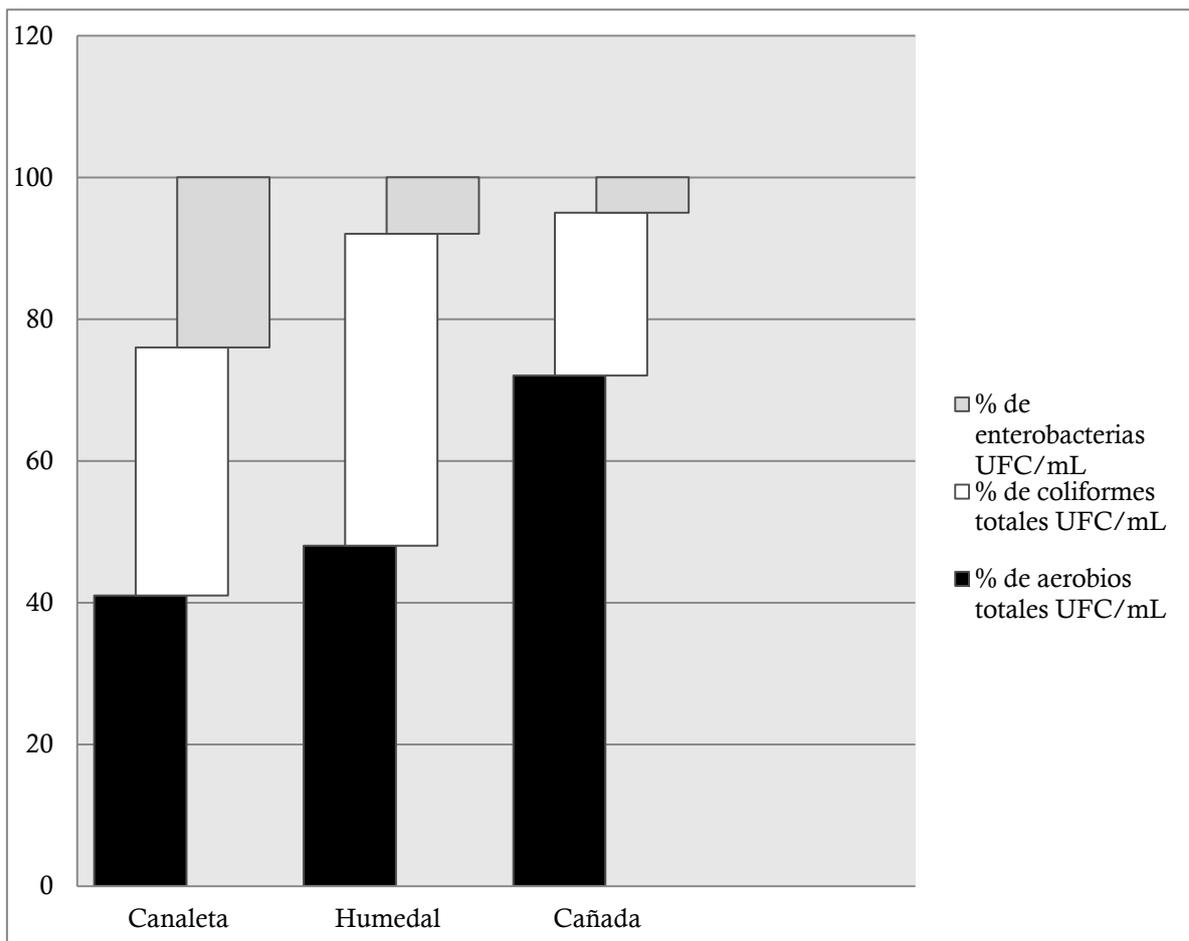


Gráfico 5. Determinación de microorganismos aerobios mesófilos totales, coliformes totales y enterobacterias en muestras de agua en "gradiente" en Playa Penino

Escalamiento multidimensional (MDS)

Las variables para el análisis de escalamiento multidimensional fueron elegidas de acuerdo a los índices de correlación de la Sección IA, en este caso sin embargo, se utilizó fosfato en lugar de PT (ambas variables mantienen un índice de correlación de 0,9887 con $p=0,011$). El índice de stress es de 0,05 lo que indica una buena bondad de ajuste. La dimensión 1 agrupa nuevamente los parámetros de daño genético revelados por el ensayo cometa y el test de MN con la concentración de amonio y de enterobacterias. Por otro lado, se agrupan las demás variables ambientales en esta primera dimensión.

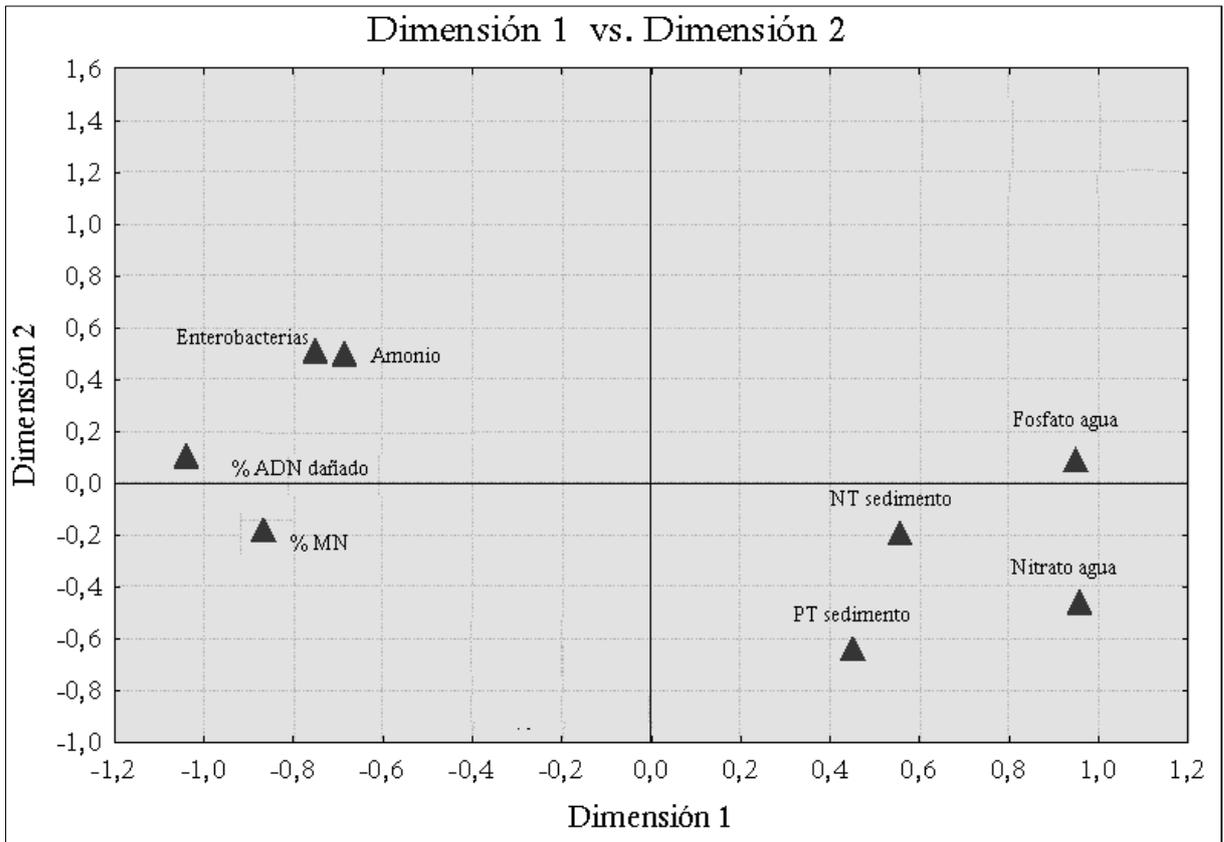


Gráfico 6. Representación de las dos dimensiones obtenidas por el MDS. Cada punto representa una variable (biológica o ambiental).

La dimensión 2, agrupa el marcador de daño agudo (%ADN dañado) con las variables concentración de amonio, enterobacterias y concentración de fosfato en agua. Sin embargo, la segunda dimensión agrupa el marcador de daño genético crónico (% MN) con las variables NT, PT y nitrato.

Discusión

Biomarcadores de genotoxicidad

Los valores de daño genético para los parámetros TMO y % de ADN dañado, decrecen con el gradiente CANALETA, HUMEDAL, CAÑADA. Los valores obtenidos en las muestras de individuos cuyas cuevas están sobre las CANALETAS, son sensiblemente superiores a los obtenidos para el resto de los sitios. Los valores hallados en este trabajo para ambos marcadores, son significativamente mayores a los hallados por Kopjar y cols. (2008), en sangre de peces que habitan ríos contaminados por efluentes urbanos (los valores en los sitios donde se hallaron mayores niveles de daño fueron para % ADN dañado, 3,20 y para TMO, 0,45). Esto implica la existencia de daño agudo o exposición reciente a sustancias genotóxicas. Los valores de TMO hallados en este trabajo superan ampliamente los valores máximos encontrados por Liney y cols. (2006), en muestras de tejidos de peces de agua dulce (*Rutilus rutilus*) sometidos a contaminación de aguas residuales (TMO < 2 en sangre y < 7 en branquias. En análisis desarrollados sobre sangre de peces teleósteos en sitios de cercanos al efluente de una curtiembre en Corrego dos Bagres (San Pablo), se hallaron valores inferiores o similares (44,33 y 62,0) a los encontrados para el % ADN dañado en las muestras de las CANALETAS (Matsumoto y cols, 2006). Wirzinger y cols. (2007) analizaron a través del ensayo cometa (% de ADN en la cola) el daño genético provocado por efluentes domésticos en ríos ubicados al noreste de Alemania; hallando valores de daño genético muy inferiores a los encontrados en este análisis para todos los sitios ensayados (5,23-9,67%).

Parámetros físico-químicos y microbiológicos

Los valores de amonio y fósforo total exceden los límites permitidos por el DECRETO 253/79, en cualquiera de los sitios analizados (CANALETA, CAÑADA, HUMEDAL) (límite permitido NH_4^+ 0.02 mg/L; PT, límite permitido 0.025 mg/L). Contrariamente, los nitratos se encuentran por debajo de los límites fijados por este decreto (10mg/L). Los valores de PT en los sitios CANALETA y HUMEDAL (495 $\mu\text{g/L}$ y 281 $\mu\text{g/L}$) superan a los hallados por Arocena y cols, (2008) para los embalses de Canelón Grande (457 $\mu\text{g/L}$) y Paso Severino (247 $\mu\text{g/L}$).

De acuerdo al valor de NT obtenido las CANALETAS son zonas hipereutróficas (FAO, 1997; Kruk y cols., 2006; Arocena y cols., 2008; Chalar y cols, 2011). El valor internacional para NT es de 1.87 mg/L; las muestras correspondientes a HUMEDAL y CAÑADA se encuentran por debajo de ese límite (se recurre a la normativa internacional al no existir reglamentación nacional al respecto) (US-EPA, DIGESA). En ninguno de los sitios los valores superaron a los hallados por Arocena y cols, (2008) en los embalses de Canelón Grande y Paso Severino (4884 $\mu\text{g/L}$, Canelón Grande y 4962 $\mu\text{g/L}$, Paso Severino).

Las relaciones N/P en los sitios son: CANALETA 4, CAÑADA 8, HUMEDAL 3. Excepto para la CAÑADA que cumpliría con los valores citados por Salas (1996) los cuales varían de 7:1 a 9:1, para los demás sitios el nitrógeno sería el nutriente limitante, lo que indicaría un exceso de aporte de fósforo y amonio probablemente debido a las descargas de aguas servidas. El fósforo a diferencia del nitrógeno no se obtiene de la atmósfera, es parte de los productos de excretas de los seres vivos y se encuentra contenido principalmente en los fertilizantes, pesticidas, detergentes y aguas servidas entre otros (Márquez y cols, 2007).

Siendo las CANALETAS el aporte principal de nutrientes al sitio HUMEDAL, si analizamos los datos en conjunto (gráficos de nutrientes y gradiente de disminución del daño genético), se podría suponer que el HUMEDAL está funcionando como un “purificador” de nutrientes en el agua, ya que los valores para los nutrientes medidos disminuyen en las muestras de este sitio y concomitantemente, los valores obtenidos en la CAÑADA (zona de conexión del humedal con la playa) son inferiores para todas las variables biológicas y ambientales estudiadas. Varios autores han demostrado la efectividad de los

humedales en la reducción de materia orgánica, en la transformación y asimilación de nutrientes y en la retención y/o eliminación de sustancias tóxicas (Arias y Brix, 2003; Lahora, 2002).

Los valores de las muestras provenientes de las CANALETAS para los sedimentos son de 254 mg/Kg para el PT y de 1490 mg/Kg para el NT, se encuentran por encima de valores reportados por Kruk y cols. (2006) para la Laguna del Diario, donde existe un fuerte aporte de nutrientes debido a pozos negros. Un exceso de N y/o P nos puede indicar exceso de nutrientes, una falta de asimilación o ambos (Newman y Clements, 2008). Probablemente los procesos de nitrificación del amonio no ocurren o se dan en forma muy lenta. La liberación del fósforo probablemente se encuentre alterada al menos en las CANALETAS (Sales, 2008; Nowlin y cols, 2005).

De acuerdo al Decreto 253/79 ya mencionado que establece un límite medio de 1000 ufc/100 ml para coliformes fecales en aguas clase 3, y de 500 a 1000 ufc/100 ml para aguas de tipo 2, existe un exceso de coliformes fecales en las muestras del HUMEDAL (1600 ufc/100 ml) y en las CANALETAS (2100 ufc/100 ml). En el caso de éstas últimas, debemos considerar además, que las mismas están sumamente próximas a pozos que proveen de agua a los pobladores. Esto es coherente con los altos valores de daño genético hallados en muestras de sangre de individuos capturados en esas zonas. Cabe destacar, que la Agencia de Protección Ambiental (EPA), regula a través de estándares para coliformes totales y fecales, el agua cuyo destino es el consumo público. Sin embargo, no hay requerimientos para pozos de agua, manantiales u otras fuentes de agua de carácter privado. Los análisis de calidad en estos casos, deben ser realizados por los dueños de los predios. Sin embargo, en la bibliografía se sugiere que las fuentes de agua se analicen idealmente cuatro veces al año y como mínimo una vez al año (Apella y Araújo, 2005; Oran, 2012).

Los niveles de contaminación bacteriológica hallados, se encuentran por encima de los niveles guía para fuentes de agua potable, uso para riego, consumo de productos acuáticos y uso recreativo (DECRETO 253/79, Código de aguas, Uruguay). Oliva y Pérez (2005), analizaron muestras de aguas del lago de Izabal y de Río Dulce, en Guatemala, hallando valores de coliformes fecales inferiores a los encontrados en este trabajo para las muestras de las CANALETAS y HUMEDAL (lago Izabal 454 ufc/100 ml y Río Dulce 62 ufc/ 100 ml).

Análisis de escalamiento multidimensional

Nuevamente en esta sección, el MDS confirma la asociación entre el amonio y las entrobacterias con los parámetros de daño genético agudo y crónico, medidas por los marcadores de genotoxicidad sobre linfocitos de *Ctenomys*. De todas formas, los altos niveles de nutrientes que han alterado la integridad ecológica del humedal afectan a los individuos centinela como lo indica la segunda dimensión que asocia el % de MN con las variables ambientales vinculadas con el aporte de PT, NT y nitratos en agua y sedimento. Como ya fue mencionado los compuestos nitrogenados (amonio y nitratos) que se transforman en nitritos en el aparato digestivo de los mamíferos por acción microbiana, disminuye el transporte de oxígeno bloqueando su transporte por la hemoglobina. Asimismo, los compuestos nitrogenados ingeridos en el agua en forma excesiva, son susceptibles de transformarse en nitrosaminas, cuyo potencial teratogénico y carcinogénico es reconocido (Jensen, 2003; Camargo y Alonso, 2006).

Bibliografía

- Aldabe, J.; Mejía, P. y Morena, V. (2009). Propuesta de proyecto de selección y delimitación del área Humedales del Santa Lucía para su ingreso al Sistema Nacional de Áreas Protegidas. MVOTMA. Uruguay.
- Andersen, J. (1996). An ignition method for the determination of total phosphorus in lake sediments. *Water Res.* 10: 329-331.
- Apella, M. y Araújo, P. (2005). Microbiología de agua. Conceptos básicos. Cap. 2. SolarSafeWater. Pp. 33-50.
- APHA; AWWA; WPCF. (1995). Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Ed Díaz Santos SA. Barcelona.
- Arias, C. y Brix, H. (2003). Humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina.* 13: 17-24.
- Arocena, R.; Chalar, G.; Fabián, D.; de León, L.; Brugnoli, E.; Silva, M.; Rodó, E.; Machado, I.; Pacheco, J.; Castigioni, R. y Gabito, L. (2008). Evaluación ecológica de aguas y biomonitorio. DINAMA, S. Limnología, Facultad de Ciencias. Pp.24.
- Camargo, J. y Alonso, A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International* 32: 831–849.
- Chalar, G.; Arocena, R.; Pacheco, J. y Fabián, D. (2011). Trophic assessment of streams in Uruguay: A Trophic State Index for Benthic Invertebrates (TSI-BI). *Ecological Indicators.* 11: 362–369.
- DIGESA. <http://www.digesa.minsa.gob.pe/>

FAO (Food and Agriculture Organization), (1997). Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos. ISBN 92-5-303875-6.

Jensen, F. (2003). Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comp Biochem. Physiol.* 135A:9-24.

Kopjar, N.; Mustafic, P.; Zanella, D.; Buj, I.; Caleta, M.; Marcic, Z.; Milic, M.; Zdravko, D. y Mrakovcic, M. (2008). Assessment of DNA integrity in erythrocytes of *Cobitis elongate* affected by water pollution: the alkaline comet assay study. *Folia Zool.* 57(1-2): 120-130.

Kruk, C.; Rodríguez-Gallego, L.; Quintans, F.; Lacerot, G.; Scasso, F.; Mazzeo, N.; Meerhoff, M. y Paggi, J. (2006). Biodiversidad y calidad de agua de 18 pequeñas lagunas en la costa sureste de Uruguay. En: Menafrá, R.; Rodríguez-Gallego, L.; Scarabino, F. y Conde, D. (Org.). Bases para la conservación y el manejo de la costa Uruguaya. Montevideo, Vida Silvestre Uruguay. Pp. 599-610, ISBN: 9974758920.

Lahora, A. (2002). Depuración de Aguas Residuales Mediante Humedales Artificiales: La Edar de Los Gallardos (Almería). Gestión de Aguas del Levante Almeriense S.A. GALASA.

Liney, K.; Hagger, J.; Tyler, C.; Depledge, M.; Galloway, T. y Jobling, S. (2006). Health Effects in Fish of Long-Term Exposure to Effluents from Wastewater Treatment Works. *Environmental Health Perspectives.* 114 (1): 81-89.

Márquez, A.; Senior, W.; Martínez, G. y González, A. (2007). Concentraciones de nitrógeno y fósforo en sedimentos recientes de la Laguna Los Patos, Estado Sucre, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr.* 46 (2): 137-145.

Martino, D.; Buonomo, M. y Villalba, C. (2008). GeoUruguay: Informe del estado del ambiente. CLAES, PNUMA, DINAMA. Montevideo, Uruguay. 350 pp.

Matsumoto, Silvia.; Mantovanim M.; Ariza, M.; Dias, A.; Fonseca, I. y Marin-Morales, M. (2006). Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology.* 29 (1): 148-158.

Newman, M. y Clements, W. (2008). *Ecotoxicology: a comprehensive treatment.* CRC Press. Pp. 852.

Nowlin, W.; Evarts, J. y Vanni, M. (2004). Release rates and potential fates of nitrogen and phosphorous from sediments in eutrophic reservoir. *Freshwater Biology.* 50: 301-322.

Oliva, B. y Pérez, J. (2005) La contaminación del agua y su impacto en la salud en Guatemala. <http://www.ncenterprise.com>

Oran, B. (2012). Water Testing Bacteria, Coliform, Nuisance Bacteria, Viruses, and Pathogens in Drinking Water. Bacteria, Protozoans, Viruses and Nuisance Bacteria. B.F. Environmental Consultants Inc.

Pellejero, S.; Martínez, J.; Fernández, A. y Martínez, H. (2006). Conservación de Humedales de Santa Lucía. Pp. 18 <http://www.uruguaypiensa.org.uy/05quintopremio.htm>

Rivera, N.; Encina, F.; Palma, R. y Mejías, P. (2009). La calidad de las aguas en el curso superior y medio del río Traiguén. IX Región-Chile. *Información Tecnológica.* 20 (4): 75-84.

US-EPA. (2000). Folleto informativo de tecnología de aguas residuales. Humedales de flujo subsuperficial. EPA 832-F-00-023.

Wirzinger, G.; Weltje, L.; Gercken, J. y Sordyl, H. (2007). Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): A suitable biomonitoring tool? *Mutation Research* 628: 19-30.

SECCIÓN IC: Saneamiento y biomarcadores de daño genético en *Ctenomys*

La zona de Carrasco sur (Figura 1) es un área donde habita un porcentaje de la población Montevideana de alto poder adquisitivo, en cuyas amplias viviendas, canteros y plazoletas se encuentran cuevas de *Ctenomys*. Allí se capturaron individuos para la extracción de sangre y posteriormente, como fue explicado en secciones anteriores, se procedió a su liberación. Se capturaron 20 individuos en 4 momentos del año (meses de mayo, agosto, octubre y febrero), con el objetivo de comparar los valores hallados a través de los biomarcadores de genotoxicidad obtenidos con los que se registraron en los individuos de Playa Penino. Cabe destacar, que esta zona cuenta con saneamiento (IMM, Desarrollo Ambiental, Sistema de Saneamiento).

Se mantuvieron individuos de *Ctenomys pearsoni* de Playa Carrasco en bioterio con temperatura controlada, dentro de peceras con arena y las especies *Cynodon dactylon* y *Paspalum nicorae*. Sobrevivieron 5 individuos adultos (3 machos y 2 hembras) que fueron utilizados como control negativo.



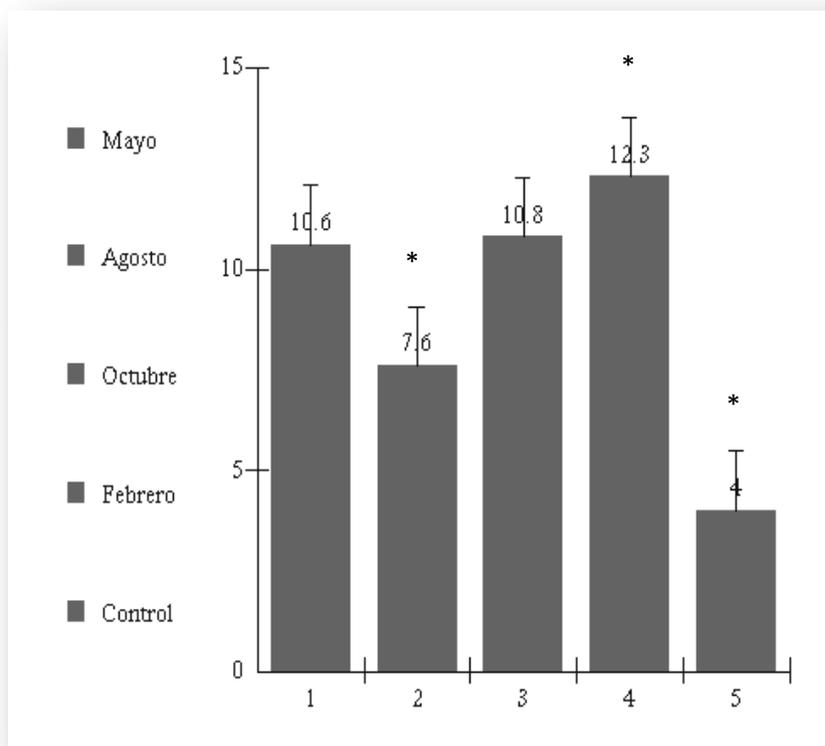
Figura 1- Vista aérea de la zona sur de Carrasco, frente al hotel Casino-Carrasco.

La metodología del ensayo cometa y el test de MN es la misma que se detalla en la Sección IA.

Resultados

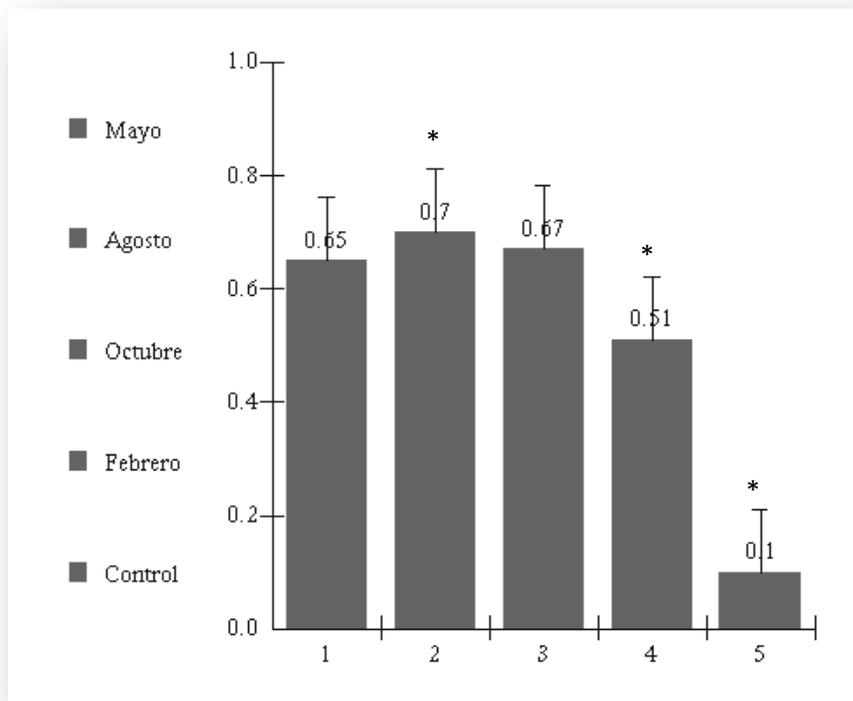
Ensayo de electroforesis en células individuales (SCGE)

Ambas variables son normales de acuerdo a Kolmogorov-Smirnov y presentan homogeneidad de varianzas de acuerdo a los test de Levene y Tukey. El ANOVA no muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0.01$) entre las muestras tanto para la variable TMO (excepto entre agosto y febrero) como para % de ADN dañado. No se constataron diferencias significativas entre sexos, por lo que se analizaron los datos sin diferenciar machos de hembras. Todas las muestras presentan diferencias significativas respecto al control.



d
i
a

Gráfico 1. Medias para la variable % ADN dañado en las muestras de la zona de Carrasco. Los * indican dif signif. $p < 0.05$



r
á
f

Gráfico 2. Medias para la variable TMO en las muestras de la zona de Carrasco. Los * indican dif signif. $p < 0.05$

Test de micronúcleos

En el Gráfico 3 se resumen los valores (en %) de eritrocitos policromáticos y de MN. No existen diferencias entre sexos por lo cual se analizaron los datos sin distinguir entre machos y hembras. Se contabilizaron 2000 eritrocitos por frotis en duplicado y se promediaron los valores por individuo. Ambas variables se compararon a través del análisis no paramétrico Kruskal-Wallis, por no cumplir con las condiciones de normalidad y homocedasticidad. El análisis revela que no hay diferencias significativas ($p < 0.01$) entre las muestras, excepto con respecto al control tanto para la variable % PCE con MN como para el % MN.

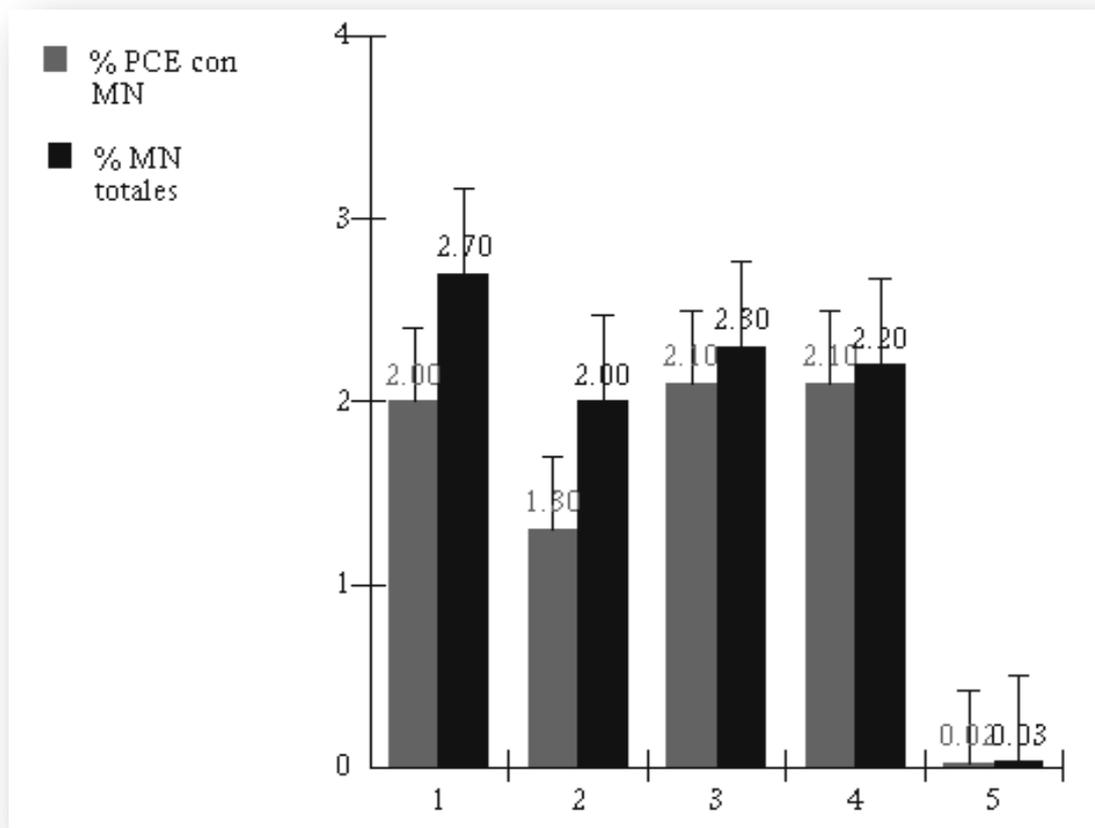


Gráfico 3. En negro se representan las medias para el porcentaje de eritrocitos conteniendo MN (% PCE con MN) y en gris las medias para el porcentaje de MN totales (% MN totales) para los meses en los cuales se tomaron las muestras: 1. Mayo; 2. Agosto; 3. Octubre; 4. Febrero; 5. Control

Biomarcadores de daño genético en Carrasco y Penino

En el Gráfico 4 se comparan las medias del % de ADN dañado y en el Gráfico 5 las medias del TMO para los valores de todas las muestras tomadas de Carrasco y de Penino (*anualizadas*; es decir utilizando los valores totales de mayo, agosto, octubre y febrero). Existen diferencias significativas de acuerdo al test de Student ($p < 0.05$) para ambas variables entre los sitios y respecto al control negativo.

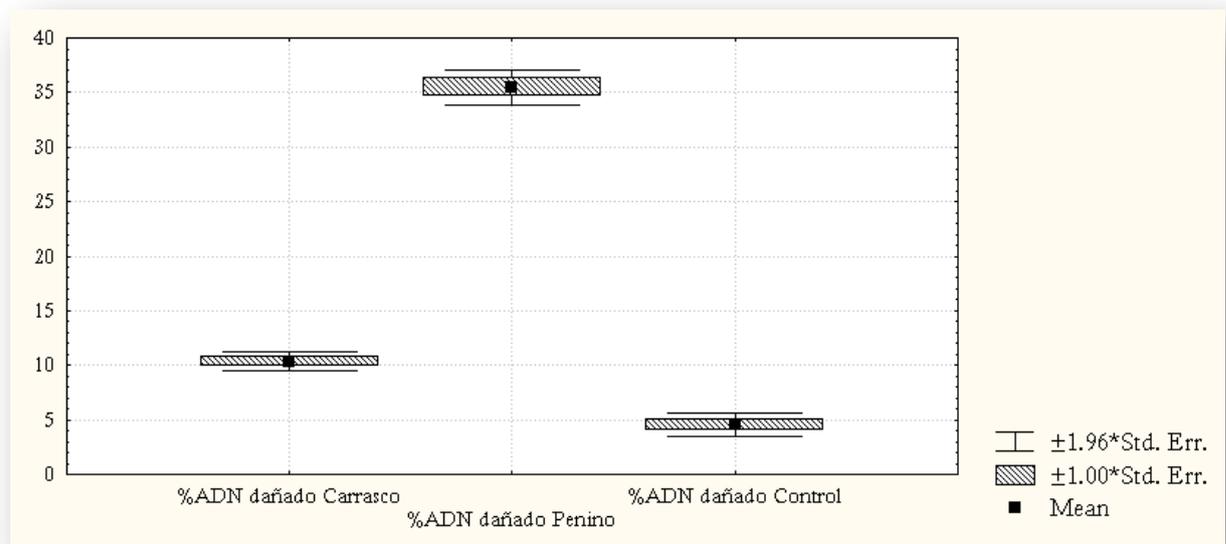


Gráfico 4. Variable % ADN dañado obtenida a través del ensayo cometa para las muestras de Carrasco y Penino. Existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los sitios y respecto al control negativo

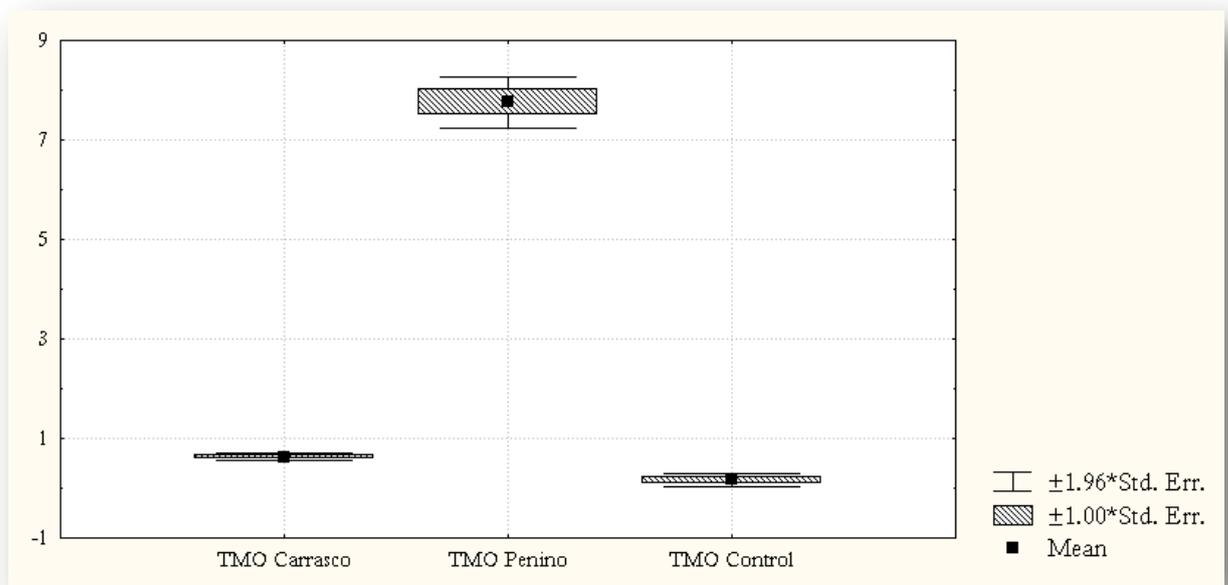


Gráfico 5. Variable TMO obtenida a través del ensayo cometa para las muestras de Carrasco y Penino. Existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los sitios y respecto al control negativo

En el Gráfico 6 se compara el porcentaje de eritrocitos con MN y el porcentaje de MN totales para los valores de todas las muestras tomadas de Carrasco y de Penino (utilizando el total de los valores de mayo, agosto, octubre y febrero). Existen diferencias significativas de acuerdo al test de Student ($p < 0.05$) para ambas variables entre los sitios y respecto al control negativo.

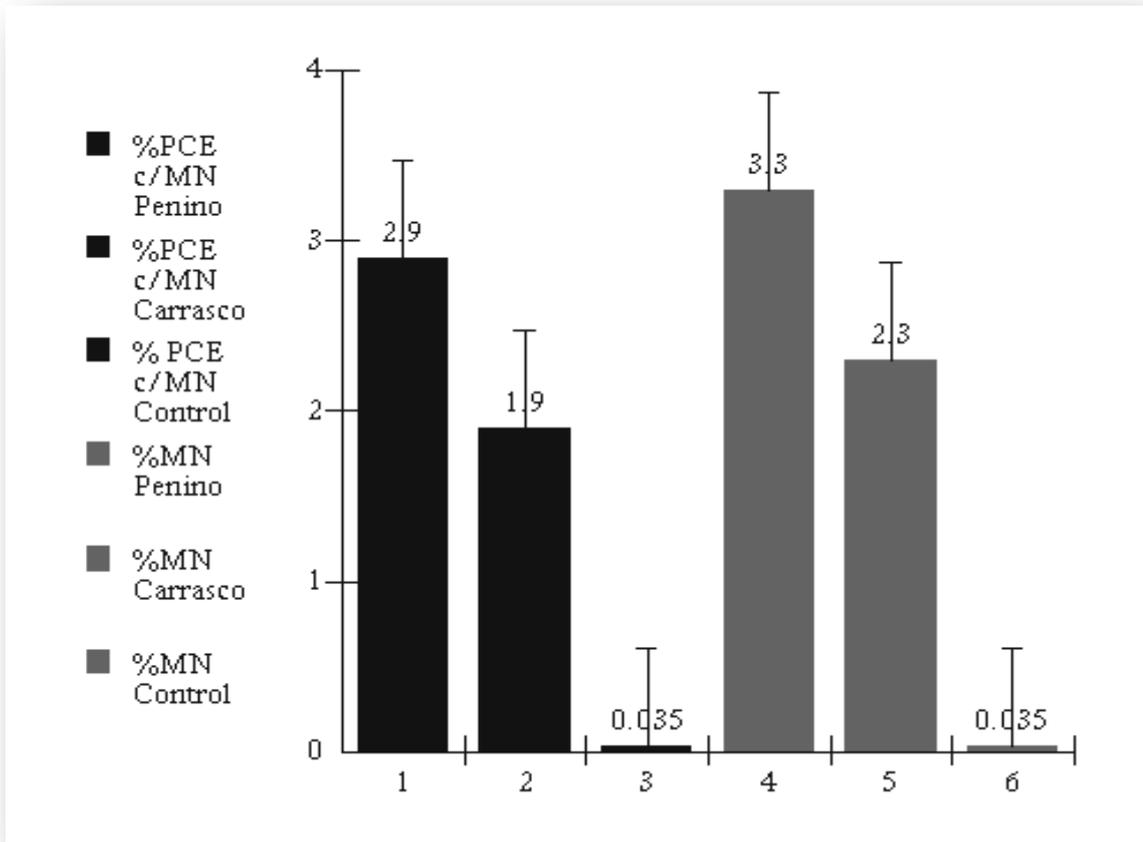


Gráfico 6. Variables % de eritrocitos con MN (%PCE c/MN) y % de MN totales (%MN) obtenida a través del test de micronúcleos para las muestras de Carrasco y Penino. Existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los sitios y respecto al control negativo

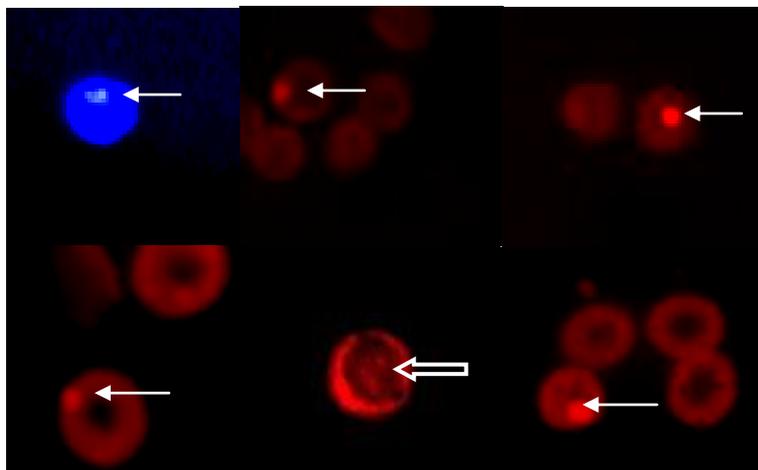


Figura 2. En los frotis de sangre periférica se observan MN (flechas blancas finas) y anillos de Cabott (flecha blanca gruesa) (lazos de ADN)

Dados los resultados de esta Sección, teniendo en cuenta que se trata de los mismos centinelas que en Playa Penino (*C. pearsoni*) y que en Carrasco los animales consumen predominantemente *Cynodon dactylon* y *Paspalum nicorae* (*Equisetum* y *Carex* sp. no se encuentran en esta zona en las áreas de captura aledáneas a las viviendas o dentro de los jardines de las mismas), las diferencias observadas en el daño genético podrían atribuirse a la descarga de efluentes cloacales en Playa Penino, que impacta las zonas habitadas por estos organismos contaminando el agua absorbida por la vegetación que consumen, hecho que en Carrasco sur no ocurre. Cabe destacar sin embargo, que las muestras de Carrasco se diferenciaron del control negativo; el daño observado podría deberse a los agroquímicos utilizados para el control de la maleza, plagas y fertilización de los jardines de las amplias viviendas de Carrasco sur.

SECCIÓN II: Ensayo de reparación de ADN e inmunolocalización de p53 y BRCA1 en linfocitos de *Ctenomys*

Reparación del material genético

Diariamente, las células luchan contra el daño genético y los errores que conducen a la senescencia y que podrían causar cáncer u otras enfermedades genéticas. La reparación del ADN es un mecanismo de defensa contra factores que afectan la integridad de genes y genomas ya sea que provengan del ambiente externo como compuestos químicos, humo de tabaco, radiación o de fuentes endógenas como errores en la síntesis de ADN o especies reactivas del oxígeno producidas durante el metabolismo celular. La información genética cambia y muta debido a la ocurrencia de errores y distorsiones, ya que el ADN puede alterarse de muchos modos diferentes; por la introducción de nucleótidos erróneos y por ruptura o degradación de una o ambas hebras (Storici, 2011).

La replicación del ADN es un proceso fundamental y fuertemente regulado que asegura la propagación precisa del material genético de las células. Una duplicación y segregación precisa del genoma es esencial, ya que cualquier región no replicada dará como resultado rupturas y deleciones durante la mitosis, incluyendo regiones que contengan genes supresores de tumores, en tanto que una excesiva replicación, generará amplificaciones posiblemente deletéreas (González y cols, 2005). Varias proteínas vinculadas a la replicación (iniciadoras y que actúan en la horquilla de replicación) tienen un papel esencial en distintas rutas de reparación del ADN, tal como reparación por escisión de bases (base excision repair, BER), reparación por escisión de nucleótidos (nucleotide excision repair, NER), rupturas doble hebra (double-strand break, DSB) y reparación por errores de apareamiento (mismatch repair) (Hubscher, 2009). Scholefield y cols. (2011) han demostrado que las proteínas que inician la replicación también están directamente relacionadas en múltiples procesos celulares, coordinando la iniciación de la misma con otras actividades vinculadas al ciclo celular y a la reparación del ADN.

Como todo proceso fundamental para una célula, el proceso de reparación del ADN está muy regulado. Las proteínas vinculadas a los puntos de control del ciclo celular (*checkpoint proteins*) se activan debido a lesiones en el ADN, deteniendo dicho ciclo (Hakem, 2008). Esa pausa en el ciclo celular permite que la célula

repare el daño genético antes de continuar dividiéndose. Los checkpoints ocurren en los límites de G1/S y G2/M, aunque también existe un checkpoint dentro de la fase S; están controlados por dos quinasas, ATM y ATR (Hohenstein y Giles, 2003).

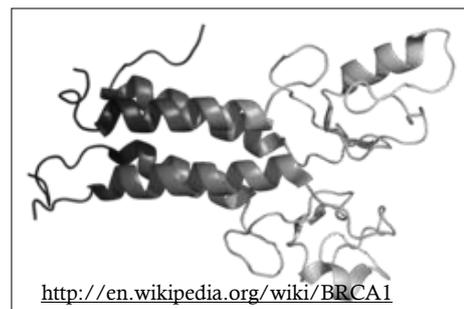
Las rupturas doble hebra, se encuentran entre las formas más perjudiciales de daño genético y pueden surgir por agentes exógenos (exposición a agentes genotóxicos) o endógenos (generación de especies reactivas del oxígeno por ejemplo) (Branzei y Foiani, 2008). En ese caso, las células generan una respuesta al daño en el ADN (DNA damage response, DDR), la cual consiste en una cascada bioquímica que conduce a la activación de p53 (Halazonetis y cols, 2008). La naturaleza de la respuesta DDR, depende de la extensión del daño y puede significar: 1. reparación del daño: 2. detención del ciclo celular a través de senescencia (gobernado por el acortamiento de los telómeros) o; 3. apoptosis (muerte celular programada) (Gorgoulis y Halazonetis, 2010).

En la reparación de genomas complejos como es el caso de los mamíferos, existen proteínas cuyas actividades en parte se solapan. Esta *redundancia genética* resulta esencial para el mantenimiento de la estabilidad de esos genomas. Además, dicha redundancia y el solapamiento que existe entre esas distintas vías de reparación, respaldan la noción de la existencia de *actividades de reparación compensatorias*. Un punto adicional en el complejo estudio de los factores de reparación del ADN, es que muchos de ellos están relacionados en otros procesos fisiológicos y actúan aún en ausencia de daño genético. Ese es el caso de los factores de la vía NER, vinculada estrechamente a la maquinaria transcripcional (Le May y cols, 2010).

Proteínas BRCA1 y p53

BRCA1

La proteína BRCA1 es una fosfoproteína nuclear, con un dominio en anillo, dos dominios C- terminales, dos señales de localización nuclear y una señal de exportación nuclear. Desde que fue identificada, se han hallado múltiples funciones vinculadas a la misma; control de la estabilidad genómica en el núcleo; regulación del ciclo celular;



activación de puntos de control (“checkpoints”); regulación de vías transcripcionales específicas; varios procesos de reparación especializados y recombinación. Muchas de sus funciones, se basan en interacciones proteína-proteína o unión directa al ADN. Las funciones vinculadas a la progresión del ciclo celular y la respuesta al daño genético de BRCA1 parecen estar reguladas por ciertos eventos de fosforilación. La proteína BRCA1 fosforilada se detecta mayormente en el núcleo y apenas en el citoplasma (se halla particularmente en las mitocondrias donde actúa también en varios procesos de reparación) (Venkitaraman, 2002).

Coene y cols. (2005) plantean que la distribución relativa de BRCA1 entre citoplasma y núcleo varía entre tipos celulares y entre las diferentes fases del ciclo celular (es decir, células no sincronizadas de un mismo tipo). Dichos autores hallaron evidencias sobre la fosforilación de BRCA1, que en respuesta al daño, migraría y actuaría en el núcleo como proteína de reparación para mantener la integridad del ADN. A través del uso de ensayos de microscopia confocal e inmunofluorescencia, así como el análisis de secciones por congelado/descongelado para microscopia electrónica de transmisión, se hallaron señales en el núcleo distribuidas por todo el nucleoplasma, pero inexistentes en el nucléolo (Coene y cols, 2005). La variedad de interacciones moleculares relacionadas con esos eventos de fosforilación son complejas y están poco estudiadas. BRCA1 es una proteína de gran tamaño, posee 1863 aminoácidos con 90 sitios potenciales de fosforilación, sin embargo, solo un pequeño número de esos sitios se correlacionan con cambios funcionales en la proteína. Por ejemplo, Scully y cols. (1997) demostraron correlación entre daño genético, localización de BRCA1 y cambios progresivos en la fosforilación de la proteína. Esta fosforilación incrementada de la proteína dependiente de ATM, ATR y Chk2, parece depender del nivel de daño, de la fase del ciclo en el que se produzca y del tipo de daño genético.

Una señal de exportación nuclear (NES; nuclear export signal) es una corta secuencia de cuatro residuos aminoácidos hidrofóbicos presentes en una proteína, que son blanco de transportadores nucleares (o exportinas) que llevan dicha proteína del núcleo al citoplasma. Tiene el efecto opuesto a la señal de localización nuclear, a la cual se unen proteínas presentes en el citoplasma para importar otras proteínas (portadoras de esas señales) al núcleo (la Cour y cols, 2004). Rodríguez y Henderson (2000) identificaron dos señales de localización nuclear (NLS), que son

un blanco sobre BRCA1 para las importinas (BARD1 se une al motivo en anillo), proteínas que median su ingreso al núcleo celular. Además, dos secuencias de exportación nuclear localizadas en el extremo amino, facilitan la salida de BRCA1 del núcleo a través de la exportina CRM1 (chromosome región maintenance 1). Cuando se produce daño genético, la exportación nuclear se suprime por un inhibidor específico de CRM1. Sin embargo, se conoce poco acerca de cómo se regula el ingreso y la salida de BRCA1 del núcleo.

La proteína p53 regula la expresión de BRCA1 por represión transcripcional luego de exposición a estrés genotóxico. BRCA1 tiene un rol muy importante en el punto de chequeo (checkpoint) G2/M, sin embargo esta proteína es más abundante en la fase S. Las células en G0 y G1 tienen las menores concentraciones de BRCA1, aumentando dicha concentración a medida que progresa G1 y alcanzando un pico máximo en la fase S, permaneciendo más elevada en G2/S en relación a G0/G1. En paralelo con los niveles de expresión de BRCA1 “ciclo celular dependientes”, esta proteína sufre hiperfosforilación hacia el final de G1 y en la fase S y es transitoriamente desfosforilada inmediatamente después de la fase M. Varios estudios muestran que drogas utilizadas en quimioterapia producen una disminución en la expresión de BRCA1 (vía disminución del ARNm y disminuyendo los niveles proteicos). Sin embargo, no se sabe mucho acerca de la regulación de la distribución subcelular de BRCA1 o de cómo esta se relaciona con las funciones dependientes de p53 tales como el detenimiento en G1 en respuesta al daño genético (Feng y cols, 2004). Estos autores plantean que el control de la localización de BRCA1 entre el núcleo y el citoplasma es un mecanismo adicional para regular a dicha proteína en respuesta al daño genético y que p53 regula una compleja cascada de efectos en respuesta al daño sobre la molécula de ADN, regulando la exportación nuclear de BRCA1. Esto implicaría que la presencia de dicha proteína en el núcleo luego de la ocurrencia de daño genético podría crear un conflicto con otros aspectos de la respuesta al daño dependiente de p53. La exportación nuclear de BRCA1 ocurre entre las 4 y las 24 horas, cuando BRCA1 ya no es requerida. La localización subcelular de BRCA1 sería entonces otra vía potencial para regular su función; predomina en el núcleo durante la fase S pero está restringida exclusivamente al citoplasma en la fase M. La transición entre la acumulación y la exclusión nuclear toma lugar en las fases G1 y G2. Estos hallazgos son consistentes con la función primaria de BRCA1 en la replicación del ADN (Arizti y cols, 2000).

Tanto p53 como BRCA1 son proteínas supresoras de tumores y están relacionadas en varios procesos celulares que van desde la reparación de rupturas doble hebra, detención del ciclo celular, apoptosis y regulación transcripcional (Arizti y cols, 2000).

La proteína p53 podría regular la exportación nuclear de BRCA1 a través de varios mecanismos. Por ejemplo, puede aumentar dicha exportación directamente a través de interacciones proteína-proteína con la propia BRCA1 o indirectamente como consecuencia del detenimiento en G1 inducido por p53. Como se mencionó anteriormente BRCA1 es necesaria para la proliferación celular y la replicación del ADN. Eliminando dicha proteína del núcleo la célula podría detener el ciclo celular en respuesta al daño genético sin generar inestabilidad genómica. Fallas en la exportación de BRCA1 del núcleo durante la detención del ciclo celular puede crear señales conflictivas y conducir a células inestables. A la luz del hecho de que BRCA1 es una proteína crítica que promueve la recombinación homóloga y la replicación, un modelo donde esta proteína sea específicamente exportada, de forma que las lesiones puedan repararse, tiene amplio apoyo (Jiang y cols, 2011). La presencia de BRCA1 en lesiones complejas que involucren rupturas doble hebra podría generar aberraciones vía procesos de recombinación homóloga en un momento inapropiado. Estos hallazgos apoyan la visión de que existe un control temporal y espacial de la proteína BRCA1. Jiang y cols. (2011) hallaron que p53, interviene en la exportación de BRCA1 desde el núcleo, vía interacciones proteína-proteína, en lugar de a través de la modulación de su transcripción. De hecho, la región C-terminal de BRCA1 llamada BRCT es crítica para la interacción con p53. En varios tipos de tumores de seno, donde la p53 es disfuncional, BRCA1 se acumula en el núcleo.

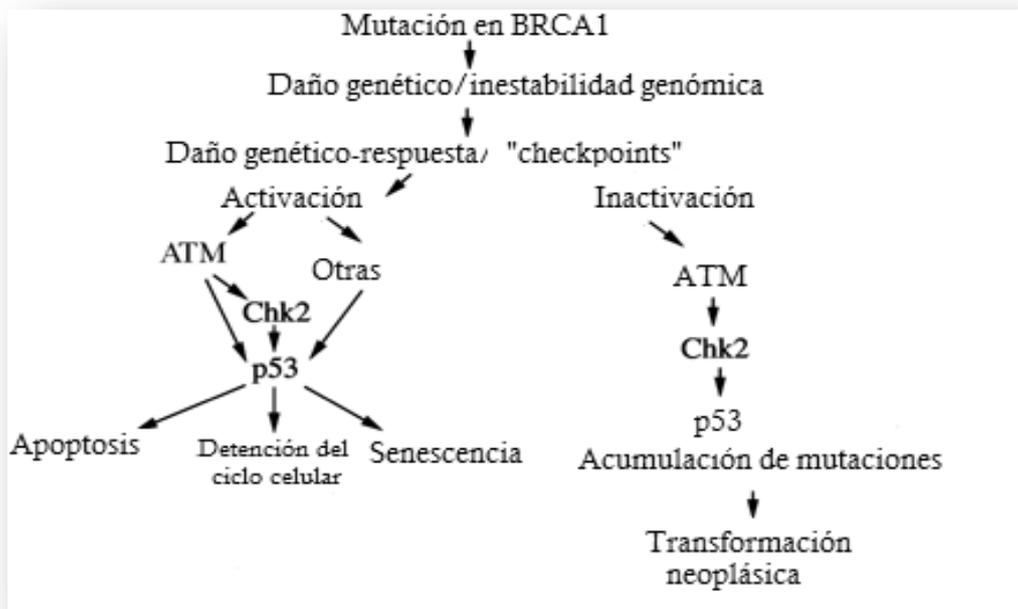
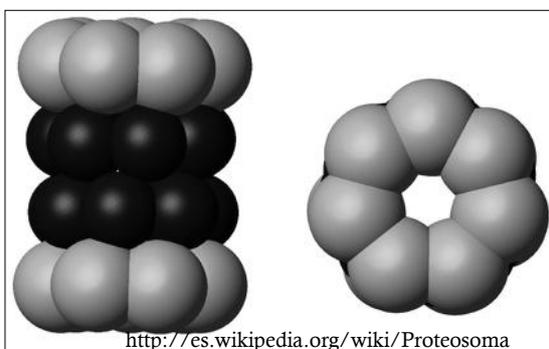
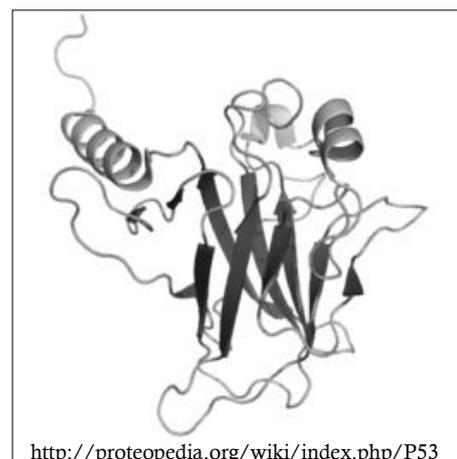


Figura 1. Múltiples funciones y relaciones de BRCA1 con otras proteínas¹⁰

p53

Los niveles de p53 están mediados por la ubiquitinación a través de la proteína MDM2 y su posterior degradación. Las ubiquitinas son pequeñas proteínas reguladoras encontradas en la mayoría de los tejidos de los organismos eucariotas. Una de sus muchas funciones es asociarse a proteínas y marcarlas para su posterior destrucción en el proteosoma (reciclaje proteico). El proteosoma es un gran complejo ubicado tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células, cuya función es



degradar y reciclar proteínas innecesarias. Posee forma de barril y contiene un "núcleo" compuesto de cuatro anillos apilados alrededor de un poro central. Cada uno de estos anillos está compuesto por siete proteínas

¹⁰ La apoptosis se considera una forma de muerte celular que, a diferencia de la necrosis, es ordenada, programada y dependiente de energía, que implica la activación de un grupo de enzimas proteolíticas denominadas caspasas y una cascada molecular intracelular hasta la desaparición completa de la célula. La senescencia celular se define como la pérdida irreversible de la capacidad proliferativa de la célula que al mismo tiempo se encuentra en un estado metabólicamente activo.

individuales. Los dos anillos internos contienen subunidades proteicas, conformando los sitios activos de las proteasas. Estos sitios se encuentran en las caras internas de los anillos, de manera que la proteína a ser degradada tiene que entrar a través del poro antes de ser procesada (Kimura y Tanaka, 2010).

Boyd y cols. (2011) plantean que la función nucleolar es extremadamente sensible al estrés celular y puede actuar como un sensor al estrés que impide que p53 sea degradada. Aunque la relación entre estrés nucleolar y estabilización de p53 es ampliamente reconocida, estos autores plantean dos modelos referidos a los mecanismos subyacentes: 1. Basado en la relocalización de componentes difusibles (mecanismos de señalización) que pueden alterar la interacción p53-MDM2; 2. Basado en una relación directa (estructural) del nucléolo en la ubiquitinación de p53 y su transporte. A través del uso de heterocariontes (*heterokaryon*) (dos núcleos en diferentes condiciones, uno con estrés genético y el otro en un estado estable coexistiendo en un mismo citoplasma). Boyd y cols. (2011) encontraron que el modelo de intermediarios móviles retransmitiendo señales de estrés nucleolar a inhibidores de la ubiquitinación de p53 mediada por MDM2 no explica la ubicación estable de p53 en dichos ensayos (los niveles de esta proteína eran independientes y característicos de cada núcleo y de su estado, a pesar de compartir el mismo citoplasma).

Existen dos rutas, una de exportación de p53 independiente del estrés genético (SEI) y otra que depende de él (SSE). Si SSE depende de la función nucleolar, un núcleo sin nucléolo solo podría desarrollar SIE y mostrar altos niveles de p53. Varios experimentos confirmaron esta predicción, demostrando que núcleos sin nucléolo expresaron mayores niveles de p53. Datos recientes, sugieren que el nucléolo podría ser un sitio de ubiquitinación (Latonen y cols, 2011).

Las dos vías de exportación de p53 mencionadas (SEI y SSE), concuerdan con evidencias recientes que sugieren que la monoubiquitinación de p53 es un evento distinto y con una consecuencia biológica diferente a la poliubiquitinación de dicha proteína. La monoubiquitinación parece promover la exportación nuclear sin conducir a la degradación, siendo la exportación de la forma poliubiquitinada la que conduce a tal evento (Carter y cols, 2007). Aunque la poliubiquitinación de p53 está estrechamente ligada a su exportación, el tránsito de MDM2 a través del nucléolo es necesario para la ubiquitinación y exportación de p53. Por tanto, esos eventos bioquímicos dependen de un nucléolo funcional. El mismo es un sitio que regula la actividad de ciertas proteínas de un modo dependiente del estrés genético.

El rol directo del nucléolo en la regulación de p53 apoya el modelo 2 mencionado más arriba. Aún no hay evidencias contundentes acerca de si la degradación de p53 ocurre en el núcleo o en el citoplasma (Carter y cols, 2007).

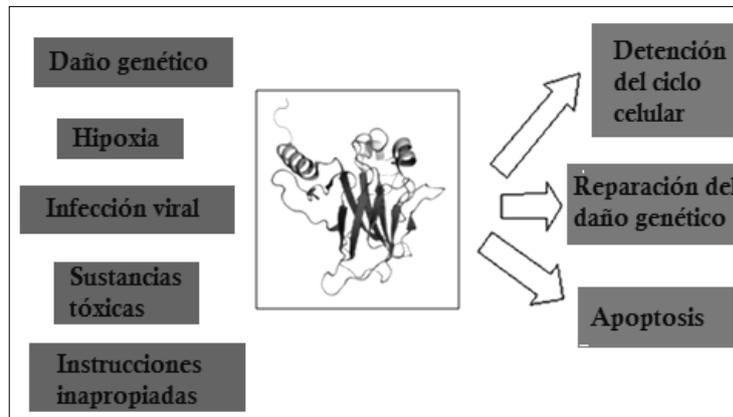


Figura 2. Procesos que desencadenan la actividad de p53 y eventos a los que puede conducir su actividad

Agentes genotóxicos: bleomicina

La bleomicina es un compuesto producido por la bacteria *Streptomyces verticillus*. Es un agente antineoplásico y se utiliza en el tratamiento del linfoma de Hodgkin, en el carcinoma de células escamosas y en el cáncer testicular. Bioquímicamente, la bleomicina es un glucopéptido que contiene varios aminoácidos y azúcares y un extremo amino terminal que varía entre los diferentes análogos de la bleomicina. Se han encontrado pocas diferencias en cuanto a la actividad o mecanismos de acción entre esos análogos. La bleomicina se comporta como radiomimético e induce un amplio espectro de lesiones mutagénicas en células de mamíferos, incluyendo daño en bases del ADN, sitiosapurínicos y apirimidínicos, alteraciones en el ARN y la generación de sitios álcalilábiles que resultan en roturas de cadena sencilla y doble (Wei y cols, 2005). Además, al igual que otros agentes químicos, entre ellos el peróxido de hidrógeno, la bleomicina genera daño oxidativo en el ADN a través de la producción de radicales de oxígeno. En células eucariotas, la genotoxicidad de estos compuestos ha sido investigada concluyéndose que ambos producen aberraciones cromosómicas, mutaciones en genes y roturas de cadena de ADN. La bleomicina está clasificada como un agente clastogénico directo, puesto que no necesita activación metabólica para ejercer su actividad y actúa de forma independiente de la fase S de replicación del material genético en el ciclo celular. Es por ello frecuente el uso de este

compuesto como agente inductor de daño en estudios de medida de la capacidad de reparación celular. Los agentes S-independientes como la bleomicina inducen aberraciones de tipo cromosómico cuando actúan en las fases G0 y G1 del ciclo celular, aberraciones de tipo cromátida cuando actúan en G2 y una mezcla de ambas cuando actúan en fase S (Wozniack y cols, 2004).

Agentes genotóxicos: MMS

El metil metano sulfonato (MMS) es una agente alquilante que transfiere grupos metilo a las bases nitrogenadas y forma aductos de ADN (un aducto es un complejo que se forma cuando un compuesto químico se une a una molécula biológica, como ADN o proteínas). Los agentes alquilantes son moléculas que reaccionan con el ADN ocasionando cambios químicos en las bases lo que genera la ocurrencia de apareamientos incorrectos. Se llama transición si una purina (A-G) o una pirimidina (T-C) son reemplazadas por bases del mismo tipo; se denomina transversión si una purina es sustituida por una pirimidina. Los agentes alquilantes, junto con la luz ultravioleta son los agentes mutagénicos más potentes. Los compuestos más conocidos son el etil metano sulfonato (EMS), metil metano sulfonato (MMS), mostaza nitrogenada, etc. Son agentes S-dependientes, es decir que inducen aberraciones de tipo cromátida en todos los estadios celulares, las aberraciones cromosómicas serán visualizadas luego de que las células atraviesen un período de fase S (Díaz y Domínguez, 2010). Algunos agentes alquilantes como el MMS, son capaces de producir procesos de recombinación, aunque no se conoce exactamente a través de qué mecanismo. Su principal efecto parece ser la metilación de bases, generando 7-desoxiguanina y 3 metil adenina (3MeA), pero no genera rupturas doble hebra (DSB). Las lesiones de tipo 3MeA bloquean la síntesis de ADN, generando procesos recombinacionales (Ribeiro y cols, 2003).

Cinética de reparación: Ensayo cometa

La exposición a agentes mutagénicos puede producir importantes alteraciones en el ADN, debido a efectos genotóxicos directos y/o al surgimiento de anomalías en la maquinaria de reparación celular. Estas alteraciones podrían en consecuencia reducir la capacidad de las células de reparar el ADN dañado, lo que disminuiría la defensa del individuo frente a exposiciones posteriores y favorecería

la aparición y el desarrollo de los procesos patológicos. El fundamento de este ensayo consiste en que las células expuestas a un determinado agente pueden tener deteriorada su maquinaria de reparación del ADN, disminuyendo así la capacidad de reparación del daño inducido. Cuando esas células son tratadas posteriormente con un mutágeno “in vitro” presentarán incrementos significativos en el daño genético respecto a células no expuestas, y esto puede ser evaluado mediante la aplicación de diversos marcadores de daño genético. Muestras celulares de células cultivadas en presencia de un determinado agente mutagénico (en estudios *in vitro*), son inducidas a desarrollar lesiones en su ADN mediante algún agente inductor (lo que se denomina challenge: “reto”). Posteriormente, empleando diversos tests de genotoxicidad se evalúa el daño a diferentes tiempos. Lo más habitual es medir a tiempo 0 (inmediatamente después del tratamiento con el agente inductor) y después de uno o varios tiempos de reparación. El descenso en el daño genético evaluado se toma como medida de la capacidad de reparación del ADN (Valdiglesias y cols, 2008).

Objetivos de la Sección II

- ✓ Analizar a través del ensayo cometa la capacidad de reparación de linfocitos aislados de *Ctenomys*, sometidos a la acción de agentes alquilantes (bleomicina y MMS).
- ✓ Analizar la localización de dos proteínas significativas en la reparación del ADN a través de inmunocitoquímica, utilizando microscopia confocal; BRCA1 y p53, frente al daño genético producido por MMS y bleomicina.
- ✓ Constatar que el daño genético observado en los capítulos precedentes no son producto de factores intrínsecos provocados por fallas en los sistemas de reparación de los centinelas, considerando que los linfocitos fueron aislados de 24 individuos utilizados en las Secciones IA y IC.

Metodología

Para este ensayo se utilizaron 12 individuos provenientes de Playa Penino y 12 individuos provenientes de Playa Carrasco, cuyas muestras fueron utilizadas en la Sección IA y IC.

La citotoxicidad se evaluó del mismo modo que en la Sección I. Las muestras de sangre se centrifugaron y se diluyeron en PBS. Posteriormente se realizó la separación de linfocitos a través de Ficoll-histopaque (www.sigmaaldrich.com).

Cultivo de linfocitos

Se utilizaron frascos de 5 ml para cultivar a las células en medio RPMI 1640 con bicarbonato de sodio y L-glutamina, suplementado con suero fetal bovino (SFB) y antibióticos. Los cultivos se mantuvieron 24 horas, para su recuperación en estufa de CO₂.

Ensayo de cinética de reparación

Previo a la constatación del estado de las células y su concentración, se dividió el contenido de cada frasco en seis cajas de 2.5 ml (realizando de este modo el ensayo por duplicado para cada individuo). Dos cajas por individuo fueron tratadas con MMS (4 µM) a 37°C durante una hora. Dos se trataron con bleomicina (20 µM), también a 37°C y durante una hora. En este caso, las células se mantuvieron en medio de cultivo sin SFB, ya que se ha descrito que el suero puede inhibir la acción de la bleomicina (Valdiglesias y cols, 2008). Dos cajas se mantuvieron libres de mutágenos como control negativo. Las concentraciones de mutágenos elegidas, se basaron en la capacidad de los mutágenos de generar daño genético, pero no superar el 80% de muerte celular en los cultivos tratados. Se recolectaron células para el ensayo cometa y los experimentos de inmunocitoquímica, luego de una hora de tratamiento (tiempo cero), a las 12 horas (tiempo 12) y a las 24 horas (tiempo 24). El total de cajas de cultivo con las que se trabajó fue de 144.

El ensayo de electroforesis en células individuales se realizó siguiendo la metodología descrita en la Sección I.

Experimentos de inmunocitoquímica

Todo el procedimiento de inmunofluorescencia se realizó en tubos para PCR, ya que los linfocitos crecen en suspensión y no en monocapa. Los linfocitos extraídos en cada tiempo del ensayo de cinética de reparación, se fijaron en paraformaldehído al 2% en PBS 1X durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se realizaron, 3 lavados con PBS 1X en frío (10 minutos por lavado). La permeabilización se realizó con Tritón al 0.5% en PBS 1X durante 10 minutos y se lavó 3 veces con PBS frío 1X (5 minutos por lavado). Luego se procedió al bloqueo con BSA al 2% en PBS durante 30 minutos a TA (para evitar señales inespecíficas). Se centrifugó y se realizó incubación con anticuerpo primario para BRCA1 (diluyente antirabbit) (CHEMICON) durante 1 hora a TA (dilución 1/400). Se utilizaron 50 µl por tubo de PCR en cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados con PBS al 2% en BSA (10 minutos por lavado). Se procedió a la incubación con anticuerpo secundario y anticuerpo de inmunomarcación directa p53 (FITC) (CHEMICON). Se mantuvo una hora a temperatura ambiente (dilución 1/300 de p53, usando como diluyente anti-goat secundario de BRCA1; utilizando 50 µl por tubo). Se realizaron 3 lavados con PBS 1X frío (10 minutos por lavado). Se procedió a la tinción con DAPI (2µg/ml). Se realizaron los frotis y se montaron con antifade. Se sellaron los cubreobjetos con esmalte. Cada portaobjeto se analizó en microscopio confocal Olympus BX 61 acoplado a un módulo confocal Olympus Fluoview 300, con software Fluoview versión 4.3. Procedimiento modificado de MRC (Centro para Medicina Regenerativa, www.crm.ed.ac.uk).

Resultados

Ensayo de cinética de reparación

En el Gráfico 1 se muestra la disminución del daño genético expresado como % de ADN dañado, que particularmente ocurre entre las 12 y las 24 horas. Existen diferencias significativas entre todos los tiempos analizados y en relación al control, según ANOVA ($p < 0.05$). Cabe destacar que el tiempo cero corresponde a la primera recolección luego de una hora de tratamiento con bleomicina, sobre linfocitos provenientes de la población de *Ctenomys* de Playa Penino.

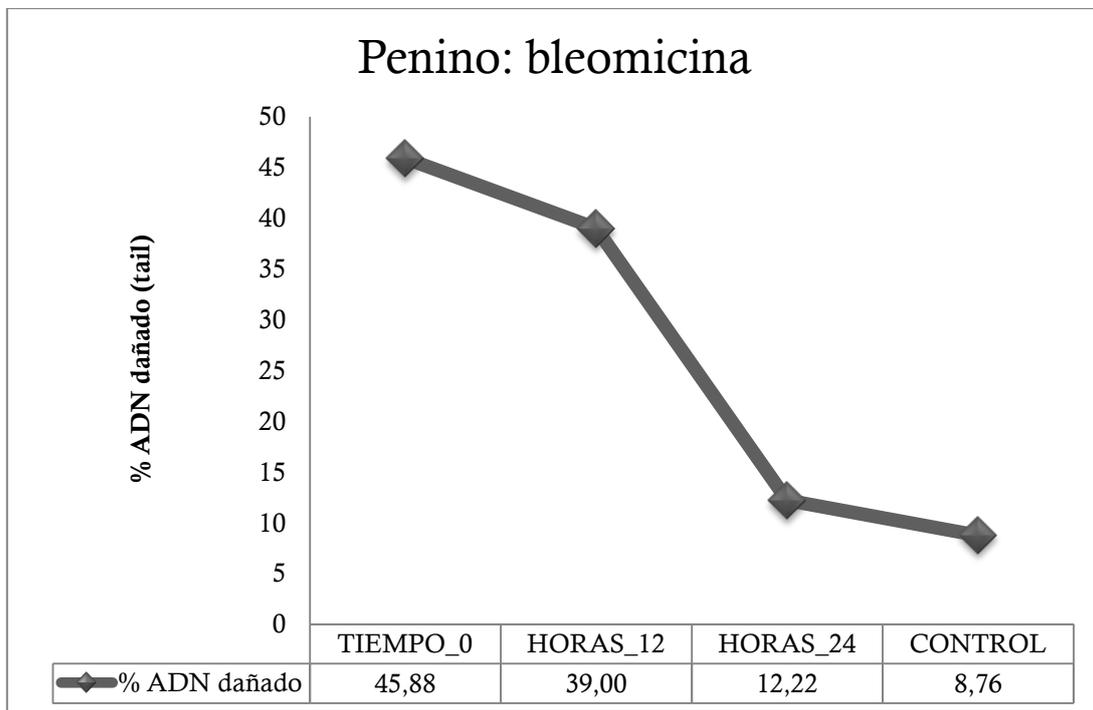


Gráfico 1. Reparación del daño luego de la exposición a bleomicina para cada tiempo analizado (Población de Playa Penino)

En en Gráfico 2 se muestra la disminución del daño genético expresado como % de ADN dañado, que a diferencia de las células de individuos de Playa Penino, se produce en forma constante. Sin embargo, existen diferencias significativas entre todos los tiempo analizados y en relación al control, según ANOVA ($p < 0.05$). Al igual que en el caso anterior, el tiempo cero corresponde a la primera recolección luego de una hora de tratamiento con bleomicina, sobre linfocitos provenientes de la población de *Ctenomys* de Playa Carrasco.

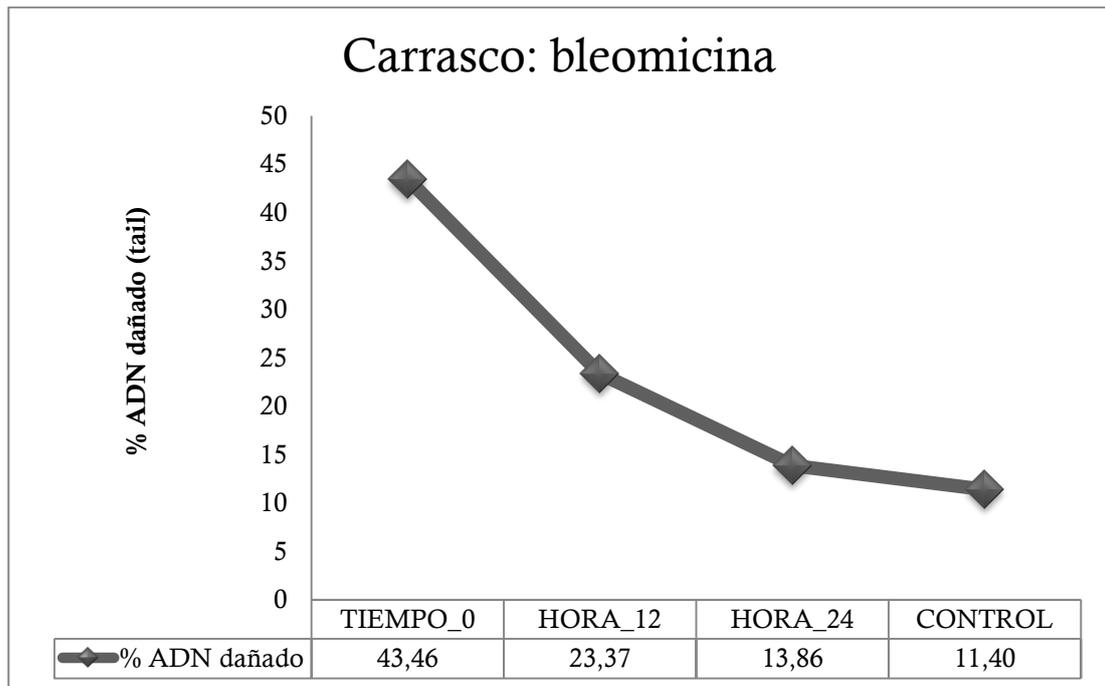


Gráfico 2. Reparación del daño luego de la exposición a bleomicina para cada tiempo analizado (población de Playa Carrasco)

En el caso del MMS para las muestras provenientes de Penino (Gráfico 3), el proceso de reparación se da de un modo muy similar al que ocurre con la bleomicina. Entre las 12 y las 24 horas, la mayoría de las células reparan el daño de su ADN, aunque existen diferencias significativas entre todos los tiempos analizados y respecto al control (ANOVA $p < 0.05$). En este caso las células correspondientes al tiempo 24, presentan menores niveles de daño que el control para el parámetro % de ADN dañado.

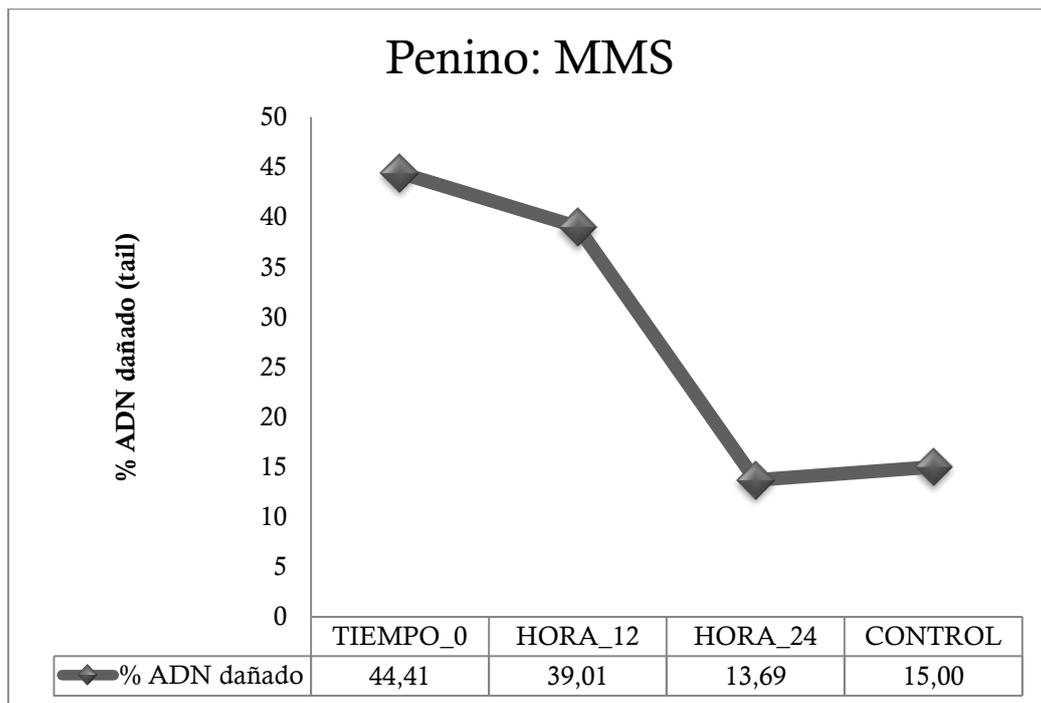


Gráfico 3. Reparación del daño luego de la exposición a MMS para cada tiempo analizado (población de Playa Penino)

Nuevamente la disminución del daño genético para las células provenientes de individuos de Playa Carrasco, es paulatino, es decir la reparación ocurre de forma constante (Gráfico 4). En este caso, el daño al inicio es el menor constatado en el tiempo cero (una hora luego del tratamiento), con respecto a los demás ensayos de reparación. Las diferencias entre el % de daño genético son significativas ($p < 0.05$), analizadas a través de un ANOVA.

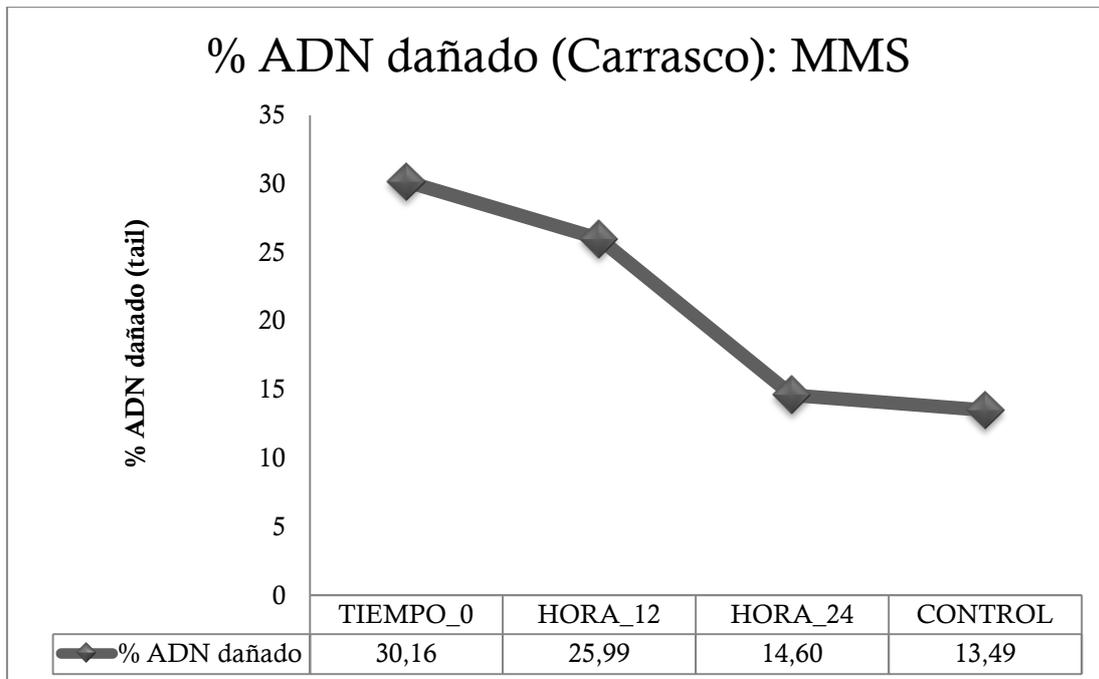


Gráfico 4. Reparación del daño luego de la exposición a MMS para cada tiempo analizado (población de Playa Carrasco)

Análisis de la localización de p53 y BRCA1

Bleomicina

La Figura 3 muestra la localización de las proteínas BRCA1 (en rojo, filtro IP), p53 (en verde, filtro FITC), ADN (en azul, filtro DAPI)¹¹, así como la co-localización de ambos anticuerpos y de los mismos con el ADN, en los tiempos estudiados para el ensayo de cinética de reparación. Las muestras corresponden a linfocitos de individuos provenientes de Playa Penino. Pasada una hora del tratamiento con bleomicina (tiempo cero), se observa una distribución claramente circunscripta el núcleo celular de ambas señales. La estructura del ADN no es homogénea. Para el tiempo “12 horas” se observan foci bien delimitados para ambas proteínas, y la estructura del ADN revelada por la tinción con DAPI es más homogénea. Algunas señales para BRCA1 y p53 comienzan a observarse fuera del núcleo al igual que en el tiempo “24 horas”, donde el núcleo aparece aún más homogéneo. El control presenta escasas señales para BRCA1 y p53 y el núcleo presenta una forma y estructura normal para la tinción con DAPI.

¹¹ Los fluoróscoros acoplados a BRCA1, p53 y tinción para ADN fueron los mismos para todos los experimentos

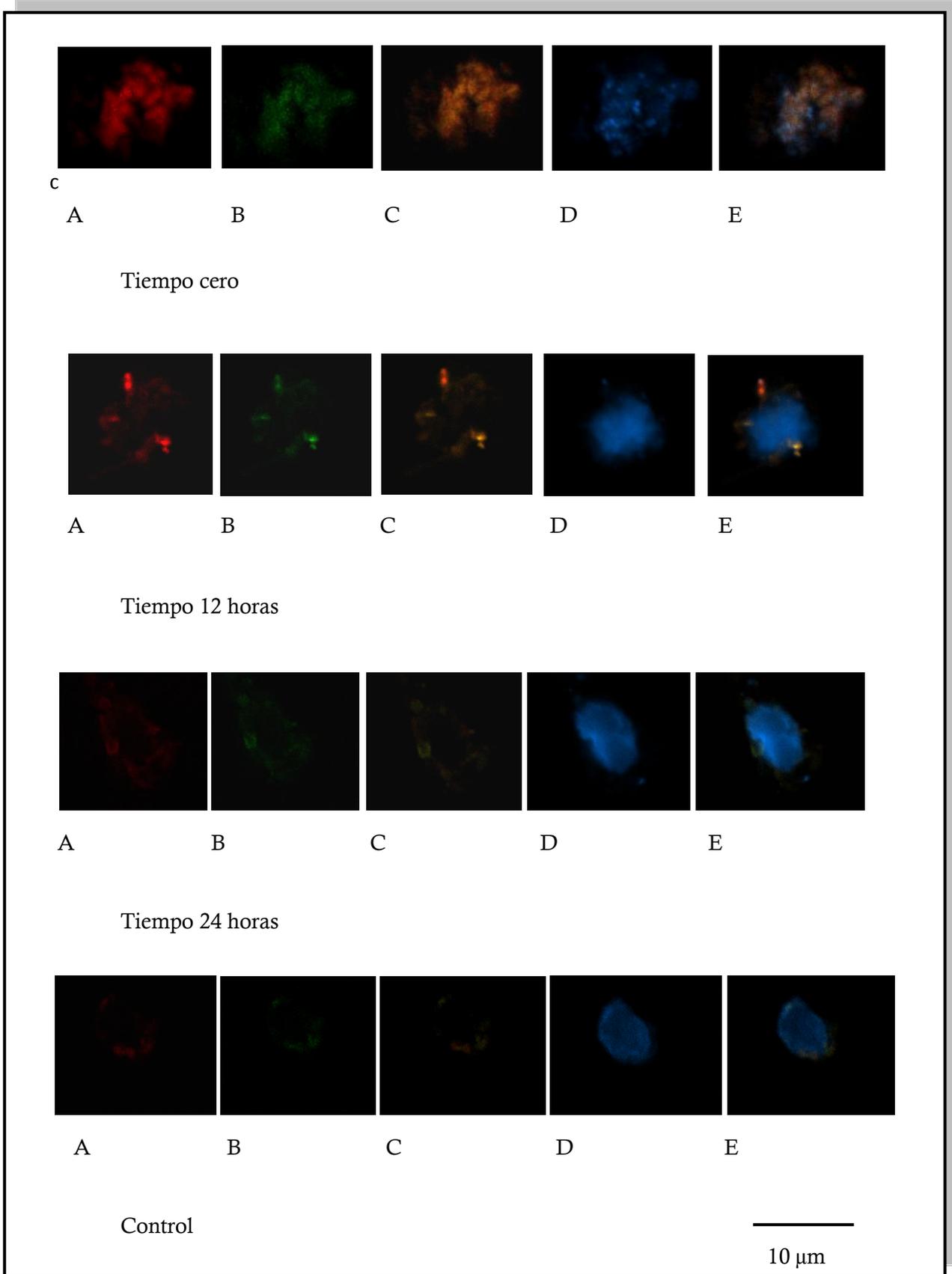


Figura 3. Señales: **A**: BRCA1 (immunolocalización indirecta en rojo); **B**: p53 (immunolocalización directa en verde); **C**: colocación de ambos anticuerpos; **D**: ADN nuclear (DAPI) y **E**: colocación de ambos anticuerpos con el ADN. Playa Penino (bleomicina)

La Figura 4 muestra la localización de las proteínas BRCA1, p53, ADN, así como la co-localización de ambos anticuerpos y de los mismos con el ADN, en los tiempos estudiados para el ensayo de cinética de reparación. Las muestras corresponden a linfocitos de individuos provenientes de Playa Carrasco. Para el “tiempo cero” y “12 horas” ambas señales proteicas se circunscriben al núcleo. En el tiempo cero la estructura del ADN no es homogénea, hecho que cambia en el tiempo “12 horas”. Para este segundo tiempo ensayado la distribución de BRCA1 y p53 se limita sólo a algunas áreas del núcleo a diferencia de lo que se observa para el “tiempo cero” donde se localizan en todo el nucleoplasma. En el tiempo “24 horas” se observan foci bien delimitados para ambas proteínas y la estructura del ADN revelada por la tinción con DAPI es completamente homogénea. Algunas señales para BRCA1 y p53 comienzan a observarse fuera del núcleo al igual que en el control, el cual presenta escasas señales para BRCA1 y p53 y donde el núcleo presenta una forma y estructura normal para la tinción con DAPI.

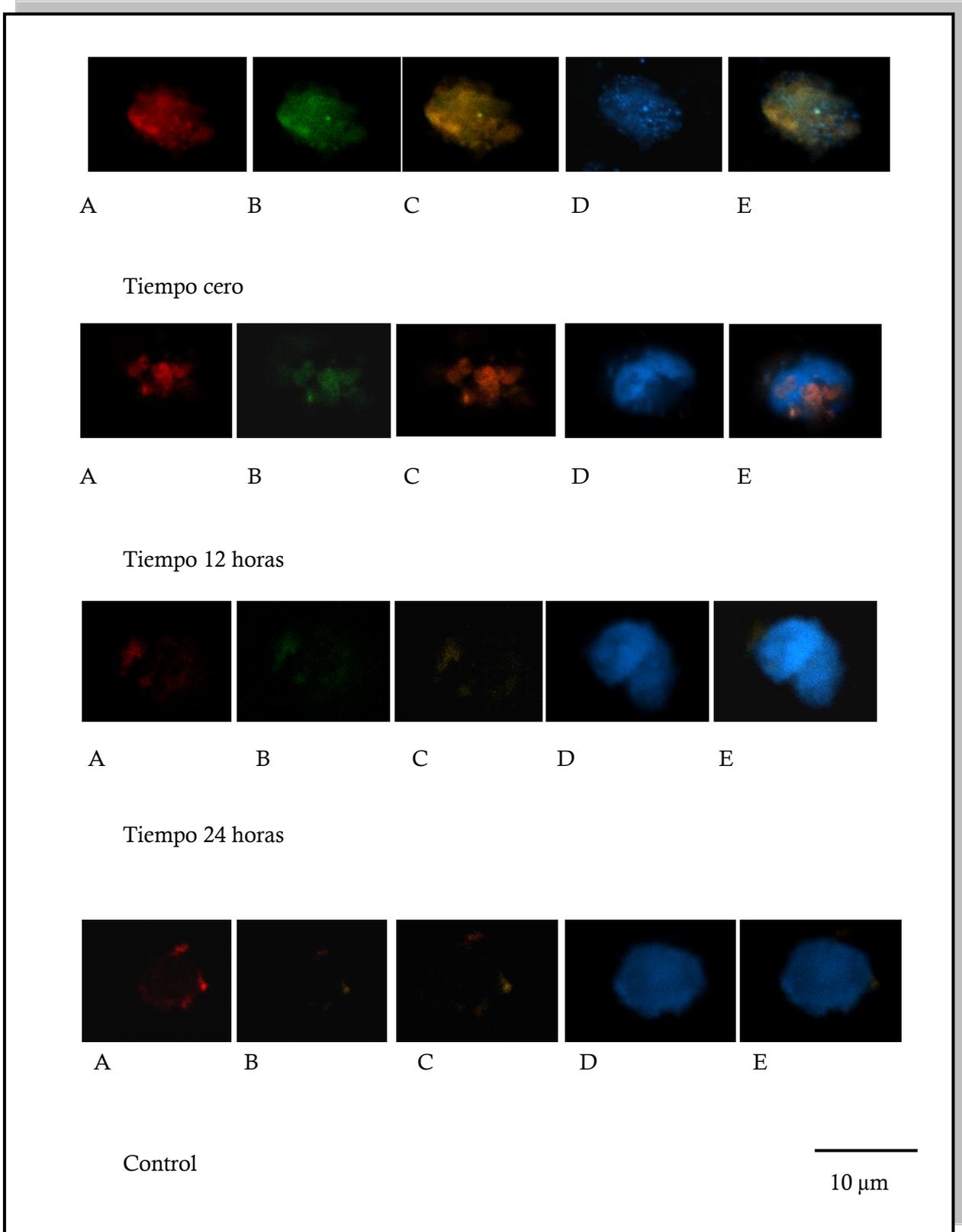


Figura 4. Señales: **A**: BRCA1 (inmunolocalización indirecta en rojo); **B**: p53 (inmunolocalización directa en verde); **C**: colocalización de ambos anticuerpos; **D**: ADN nuclear (DAPI) y **E**: colocalización de ambos anticuerpos con el ADN. Playa Carrasco (bleomicina)

MMS

La Figura 5 muestra la localización de las proteínas BRCA1, p53, ADN, así como la co-localización de ambos anticuerpos y de los mismos con el ADN, en los tiempos estudiados para el ensayo de cinética de reparación. Las muestras corresponden a linfocitos de individuos provenientes de Playa Penino tratados con MMS. Para el “tiempo cero” ambas señales proteicas se limitan al núcleo, la estructura del ADN no es homogénea, exhibiendo zonas más condensadas. Para el tiempo “12 horas” la distribución de las BRCA1 y p53 se limita a muy pocas áreas del núcleo y se observa mayormente fuera del mismo, algunas zonas del ADN todavía permanecen más condensadas que el resto. En el tiempo “24 horas” se observan foci bien delimitados para ambas proteínas y la estructura del ADN ya se presenta bastante homogénea. Las señales de BRCA1 y p53 se aprecian mayormente fuera del núcleo. En el control, se presentan débiles señales para BRCA1 y p53 y el núcleo presenta una forma y estructura normal para la tinción con DAPI.

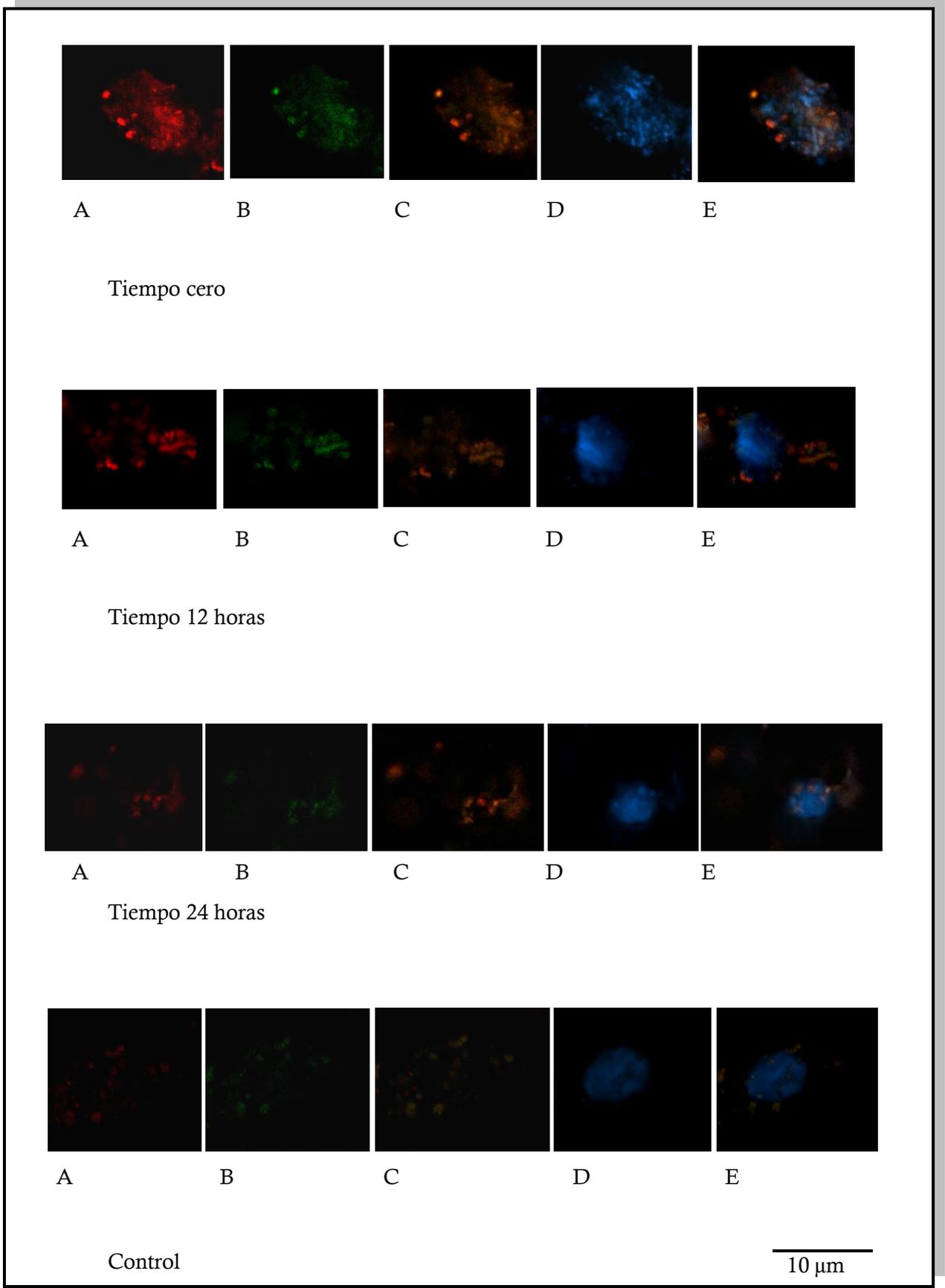
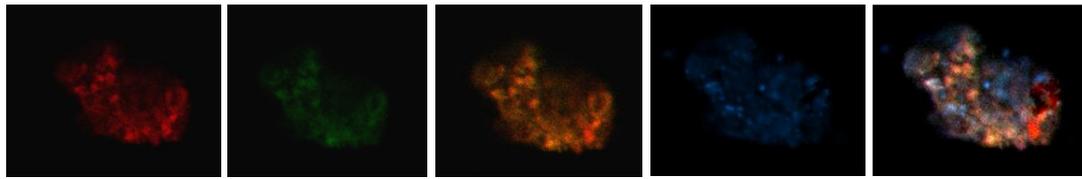


Figura 5. Señales: **A:** BRCA1 (immunolocalización indirecta en rojo); **B:** p53 (immunolocalización directa en verde); **C:** colocalización de ambos anticuerpos; **D:** ADN nuclear (DAPI) y **E:** colocalización de ambos anticuerpos con el ADN. Playa Penino (MMS)

La Figura 6 muestra la localización de las proteínas BRCA1, p53, ADN, así como la co-localización de ambos anticuerpos y de los mismos con el ADN, en los tiempos estudiados para el ensayo de cinética de reparación. Las muestras corresponden a linfocitos de individuos provenientes de Playa Carrasco tratados con MMS. Para el “tiempo cero” ambas señales proteicas se limitan al nucleoplasma, la estructura del ADN no se observa homogénea, exhibiendo zonas más condensadas. Para el tiempo “12 horas” la distribución de BRCA1 y p53 no solo se limita al núcleo sino que comienzan a observarse señales en las zonas circundantes al mismo. El ADN se observa homogéneo en el tiempo “24 horas”, persisten señales de los anticuerpos en escasas áreas nucleares, en su mayoría las señales se observan fuera del mismo. En el control, se presentan débiles señales para BRCA1 y p53 y el núcleo presenta una forma y estructura normal para la tinción con DAPI.



A

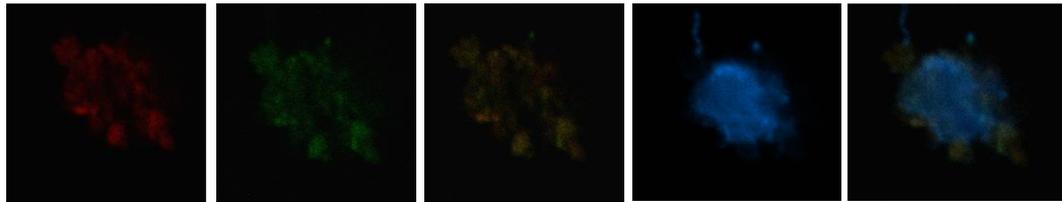
B

C

D

E

Tiempo cero



A

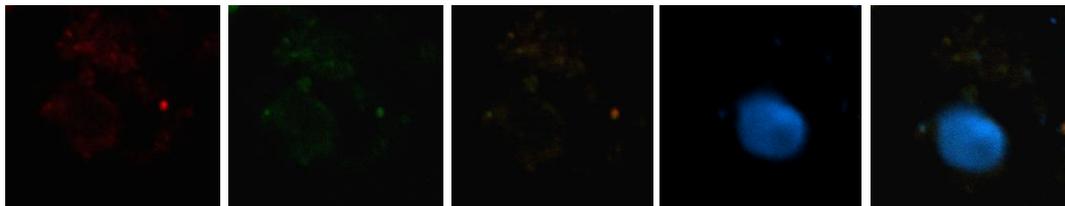
B

C

D

E

Tiempo 12 horas



A

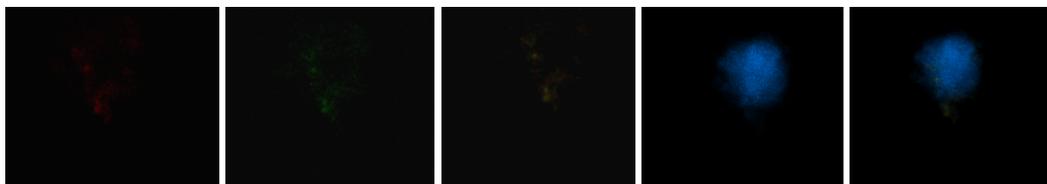
B

C

D

E

Tiempo 24 horas



A

B

C

D

E

Control

10 μ m

Figura 6. Señales: **A**: BRCA1 (immunolocalización indirecta en rojo); **B**: p53 (immunolocalización directa en verde); **C**: colocalización de ambos anticuerpos; **D**: ADN nuclear (DAPI) y **E**: colocalización de ambos anticuerpos con el ADN. Playa Carrasco (MMS)

Discusión

Como ya fue mencionado, cuando un agente mutagénico llega a la célula produce una serie de daños que de no repararse pueden provocar distintas alteraciones estructurales o metabólicas, desencadenando finalmente procesos de apoptosis y muerte celular. Los daños que puede sufrir el ADN incluyen apareamientos incorrectos, modificaciones covalentes de las bases nitrogenadas del ADN, roturas de cadena doble o sencilla, entrecruzamientos, etc. La célula posee sin embargo una serie de mecanismos de defensa frente a estos agentes que pueden, en muchos casos, evitar o disminuir el daño que inducirían en ella, como los mecanismos de detoxificación (Valdiglesias y cols, 2008). Si esta línea defensiva falla, actúa la maquinaria de reparación celular que abarca distintas vías y que está constituida por un gran número de complejos proteicos y enzimas asociadas. La reparación del ADN dañado incluye tres posibilidades: la reversión directa del daño basada fundamentalmente en la acción de enzimas (fotoliasas); la reparación por escisión, que incluye tres vías: la reparación por escisión de bases (Base Excision Repair, BER), la reparación por escisión de nucleótidos (Nucleotide Excision Repair, NER), la reparación de emparejamientos erróneos (Mismatch Repair, MMR); y finalmente la reparación de roturas de doble cadena que también implica dos vías distintas: la recombinación homóloga (Homologous Recombination, HR) y la unión final no homóloga (Non-Homologous End Joining, NHEJ) (Luque y Herráez, 2002). Si esta maquinaria no consigue reparar el daño causado por un agente dado, podrá ocurrir apoptosis o podrán desarrollarse procesos que podrían generar eventos teratogénicos o carcinogénicos (De Boer y Hoeijmakers, 2000). La importancia de estudiar la capacidad de reparar lesiones en el ADN radica por tanto, en la observación de qué mecanismos deficientes de reparación del genoma se han relacionado con la susceptibilidad de los individuos expuestos a un determinado mutágeno (Valdiglesias y cols, 2008).

Los cultivos utilizados en este estudio fueron linfocitos; dichas células crecen en suspensión y son en un inicio “cultivos asincrónicos”, es decir, hay células que pueden encontrarse en cualquiera de las fases del ciclo celular (G₀, G₁, S y M). Sin embargo, una vez aislados se mantuvieron durante 24 horas en condiciones óptimas de crecimiento para lograr un mayor número de células sincronizadas. Los controles presentaron bajos niveles de daño genético medidos por el ensayo de

células individuales o ensayo cometa, los cuales no superaron el 15%, cifra normal para un cultivo primario de células. Cabe destacar, que en dicho cultivo existen células en fase S donde el ADN se encuentra replicándose, o en fase G1 donde aumenta la transcripción, generándose en estos procesos, fragmentos de ADN por la propia replicación o por la “corrección de errores” durante dichos procesos, que se hicieron visibles, luego en el ensayo cometa (Storici, 2005). Para ambos agentes mutagénicos utilizados y en los linfocitos de ambas poblaciones de *Ctenomys*, el mayor porcentaje de ADN dañado se observó inmediatamente después del tratamiento, cuando se recogieron las primeras células para el ensayo en el denominado “tiempo cero”. Sin embargo, en los linfocitos de la población de Playa Penino, el daño genético disminuyó un poco más de 3 veces entre los tiempos “12 horas” y “24 horas”, en ambos tratamientos. En el caso de los linfocitos de Playa Carrasco, entre estos dos tiempos (“12 y 24 horas”) la disminución del daño fue menor a la mitad. En el caso del tratamiento con bleomicina, la disminución del daño genético se dio en forma constante, a diferencia de lo que ocurrió con el MMS donde la mayor parte del proceso de reparación ocurrió entre los tiempos “12 horas” y “24 horas”. Esto resulta coherente con el hecho de que el MMS es fase S dependiente, por tanto para que ciertas lesiones (por ejemplo SSB) se hagan “visibles”, es necesario que la célula atraviese la fase de síntesis de ADN (Ribeiro y cols, 2003).

En términos generales, los resultados de este trabajo coinciden con los obtenidos por Brahnan y cols. (2004), que analizaron la reparación del ADN luego de tratarlo con paclitaxel, un alcaloide vegetal utilizado como droga antineoplásica en el cáncer de ovario y de mama. Luego de las 24 horas de recuperación, estos autores hallaron una disminución significativa del daño genético a niveles similares que en las células no tratadas. También coinciden con los hallazgos de Valdiglesias y cols. (2008), que encontraron una significativa disminución del daño genético causado por bleomicina luego de un período de reparación similar al utilizado en este estudio.

En células no tratadas, p53 y BRCA1 se localizaron principalmente en el citoplasma. Transcurrida una hora y hasta 12 horas del tratamiento las proteínas se concentraron en el núcleo. Luego de 12 horas de recuperación p53 y BRCA 1 desaparecieron de los núcleos en la mayoría de las células (Solozobova y cols, 2009).

Existe un complejo denominado BASC (BRCA1-Associated Genome Surveillance Complex), “complejo de vigilancia genómica asociado a BRCA1”, que es clave en el reconocimiento y la reparación del daño genético (Wang y cols, 2000). Se caracteriza por poseer un alto número de factores relacionados con la respuesta al daño genético, por ejemplo; la reparación por apareamiento erróneo (mismatch repair), la reparación de rupturas doble hebra (DSB) y el sensor de daño global ATM¹². Una de las proteínas sobre las que actúa ATM es p53 (Wang y cols, 2000), lo que explicaría la colocalización mayoritaria observada en los ensayos de inmunocitoquímica observados en este trabajo, para cada tiempo ensayado.

Zhang y Powell (2005), sugieren que BRCA1 tiene un rol principal en la respuesta celular al daño genético, mediando entre los sensores de daño y los efectores de reparación. BRCA1 se hiperfosforila luego de exposición a agentes genotóxicos y dentro de la siguiente hora se relocaliza, lo que concuerda con lo observado en este estudio. En el “tiempo cero”, una hora luego de iniciada la exposición, una vez que las células se colocaron en medio fresco para permitir la recuperación, se tomaron las muestras para inmunocitoquímica y cinética de reparación. Estas células mostraron los mayores niveles de daño y la mayor concentración nuclear tanto de BRCA1 como de p53 para bleomicina y MMS, aunque para este último agente se observó una señal menor tanto en células de individuos de Playa Penino como de Playa Carrasco. Esto probablemente se deba a que el MMS induce mayoritariamente, rupturas simple hebra (SSB) y es necesario el pasaje de las células por la fase S para que se transformen en rupturas doble hebra (DSB), reparadas principalmente por BRCA1.

Los datos de Nassem y Webb (2008), sugieren que p53 suprime la actividad de unión al ADN de BRCA1. Dicha inhibición por asociación directa entre BRCA1 y p 53 puede prevenir la recombinación entre ADN no homólogo, tras un evento de daño genético. Esos autores, hallaron además, que la inhibición de la unión de BRCA1 al ADN puede promover la apoptosis evitando que ocurra reparación bajo condiciones extremas de daño genético. La asociación física de ambas proteínas en células transfectadas aumentó significativamente la apoptosis (Nassem y Webb, 2008). Hohenstein y Giles (2003), postulan también, que BRCA1 como parte del complejo BASC, puede funcionar como un andamio (*scaffold*) molecular, uniendo proteínas relacionadas con el ajuste fino de la respuesta de p53.

¹² ATM es una proteína quinasa que fosforila varias proteínas clave, que activan “un punto de chequeo” del ADN, conduciendo a: detención del ciclo celular; reparación del ADN o apoptosis.

Esto también explicaría la colocalización de ambas proteínas en los núcleos de los linfocitos de Playa Penino y Playa Carrasco luego de la exposición.

La proteína p53 fue denominada por David Lane quien la describió en 1992, “Guardián del Genoma”, ya que es un “sensor” del daño genético que actúa previniendo la acumulación de lesiones. De acuerdo a Braithwaite y cols. (2005), no solo cumple funciones en el control del ciclo celular y la apoptosis sino que forma parte de una diversa matriz de vías de señalización asociadas con el estrés celular y el daño genético. Estos autores hallaron que las formas de p53 en el citoplasma son inactivas, probablemente por eso a las 24 horas cuando el daño ha disminuido significativamente, las señales se observen mayormente en el citoplasma. Es posible que se trate de formas poliubiquitinadas que se dirigen al proteosoma para ser degradadas o simplemente monoubiquitinadas, exportadas fuera del núcleo pero inactivas (Carter y cols, 2007). Cabe destacar, que existen reportes que ubican a p53 (ubiquitinada) y BRCA1 (fosforilada) en las mitocondrias, aparato de Golgi y citoesqueleto, lo que explicaría en parte su presencia en el citoplasma de células que ya han reparado el daño (O’Brate y Paraskevi , 2003; Coene y cols, 2005).

El genoma de los mamíferos está sometido a la acción de múltiples agentes genotóxicos, así como a la ocurrencia de errores en procesos propios de la célula que deben ser reparados (Allison y Milner, 2004), por ese motivo probablemente en los controles no tratados aparezcan señales (aunque débiles) de ambas proteínas.

Aunque no se sabe mucho acerca de la regulación de la distribución subcelular de BRCA1 (Feng y cols, 2004), actualmente se apoya la idea de que la localización de BRCA1 entre el núcleo y el citoplasma es un mecanismo adicional para regular a dicha proteína en respuesta al daño genético y que p53 controla una compleja cascada de efectos en respuesta al daño sobre la molécula de ADN, regulando la exportación nuclear de BRCA1. En los experimentos desarrollados en este trabajo, la exportación nuclear ocurrió principalmente luego de las 12 horas, tal como hallaron Feng y cols. (2004).

La presencia de BRCA1 en lesiones complejas que involucren rupturas doble hebra podría generar aberraciones vía procesos de recombinación homóloga en un momento inapropiado. Estos hallazgos apoyan la visión de que existe un control temporal y espacial de la proteína BRCA1. Jiang y cols. (2011) hallaron que p53, interviene en la exportación de BRCA1 desde el núcleo, vía interacciones proteína-proteína, en lugar de a través de la modulación de su transcripción. De hecho, la

región C-terminal de BRCA1 llamada BRCT es crítica para la interacción con p53. En varios tipos de tumores de seno, donde la p53 es disfuncional, BRCA1 se acumula en el núcleo. Todo lo antedicho, explica la mayoritaria colocación de ambas proteínas y la disminución de las señales en los tiempos donde el ADN del núcleo aparece homogéneo, coincidente con una disminución significativa del daño cuantificada por el ensayo cometa, casi al nivel de las células no tratadas.

Todas las evidencias sugieren que el daño genético constatado en los capítulos anteriores no sería consecuencia de defectos en la maquinaria de reparación de *Ctenomys*, sino que se debe a los efectos genotóxicos de polución ambiental.

Bibliografía

Allison, S. y Milner, J. (2004). Remodelling chromatin on a global scale: a novel protective function of p53. *Carcinogenesis*. 25 (9): 1551-1557.

Arizti, P.; Fang, L.; Park, I.; Yin, Y.; Solomon, E.; Ouchi, T.; Aaronson, S. y Lee, S. (2000). Tumor suppressor p53 is required to modulate BRCA1 expression. *Mol. Cell. Biol.* 20: 7450–7459.

Boyd, M.; Vlatković y Rubbi, C. (2011). The nucleolus directly regulates p53 export and degradation. *The Journal of Cell Biology*. 194 (5): 689–703. doi10.1083/jcb.201105143

Braithwaite, A.; Royds, J. y Jackson, P. (2005). The p53 story: layers of complexity. REVIEW. *Carcinogenesis*. 26 (7): 1161-1169.

Branham, M.; Nadin, S.; Vargas-Roig, L. y Ramón, D. (2004). DNA damage induced by paclitaxel and DNA repair capability, of peripheral blood lymphocytes as evaluated by the alkaline comet assay. Institute of Experimental Medicine and Biology of Cuyo, Regional Center for Scientific and Technological Research and Argentine Foundation for Cancer Research. C.C. 855-5500.

Branzei, D. y Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9: 297-308.

Carter, S.; Bischof, O.; Dejean, A. y Vousden, K. (2007). C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53. *Nat. Cell Biol.* 9:428–435. doi:10.1038/ncb1562

Coene, E.; Hollinshead, M.; Waeytens, A.; Schelfhout, V.; Eechaute, W.; Shaw, M.; Van Oostveldt, P. y Vaux, D. (2005). Phosphorylated BRCA1 Is Predominantly Located in the Nucleus and Mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*. 16: 997-1010.

De Boer, J. y Hoeijmakers, J. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*. 21: 453-460.

Díaz, J. y Domínguez, G. (2010). Vías de reparación del ADN: nuevos blancos en la terapia contra el cáncer. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*. 15(4): 221-227.

Feng, Z.; Kachnic, L.; Zhang, J.; Powell, S. y Xia, F. (2004). DNA Damage Induces p53-dependent BRCA1 Nuclear Export. *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (27): 28574–28584. DOI 10.1074/jbc.M404137200

- González, M.; Tachibana, K.; Laskey, R. y Coleman, N. (2005). Control of DNA replication and its potential clinical exploitation. *Nat Rev Cancer*. 5: 135-141.
- Gorgoulis, V. y Halazonetis, T. (2010). Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. *Curr Opin Cell Biol*. 22: 816-827.
- Hakem, R. (2008). DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *Embo J*. 27: 589-605.
- Halazonetis, T.; Gorgoulis, V. y Bartek, J. (2008). An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*. 319: 1352-1355.
- Hohenstein, P y Giles, R. (2003). BRCA1: A scaffold for p53 response? *Trends in Genetics*. 19 (9): 489-494.
- Hoshino T.; Okamoto, M.; Sakazaki, Y.; Kato, S.; Young, H. y Aizawa, H. (2009). "Role of Proinflammatory Cytokine IL-18 and IL-1 β in Bleomycin-induced Lung Injury in Humans and Mice". *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. doi:10.1165/rcmb.2008-0182OC. PMID 19265174.
- Hubscher, U. (2009). DNA replication fork proteins. *Methods Mol Biol*. 521: 19-33.
- Jiang, J.; Yang, E.; Jiang, G.; Nowsheen, S.; Wang, H.; Wang, T.; Billheimer, D.; Chakravarthy, A.; Brown, M.; Haffty, B. y Xia, F. (2011). p53-dependent BRCA1 nuclear export controls cellular susceptibility to DNA damage. *Cancer Res*. 71: 3423.
- Kimura, Y. y Tanaka, K. (2010). Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *J. Biochem*. 147 (6): 793-808. doi:10.1093/jb/mvq044. PMID20418328.
- la Cour, T.; Kierner, L.; Molgaard, A.; Gupta, R.; Skriver, K. y Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng. Des. Sel*. 17(6): 527-36. DOI: 10.1093/protein/gzh062. PMID15314210.
- Lane, D. (1992). p53: The guardian of the genome. *Nature*. 358: 15-16.
- Latonen, L.; Moore, H.; Bai, B.; Jäämaa, S. y Laiho, M. (2011). Proteasome inhibitors induce nucleolar aggregation of proteasome target proteins and polyadenylated RNA by altering ubiquitin availability. *Oncogene*. 30:790-805. doi:10.1038/onc.2010.469
- Le May, N.; Egly, J. y Coin, F. (2010). True lies: the double life of the nucleotide excision repair factors in transcription and DNA repair. *J Nucleic Acids*. Vol. 2010, Article ID 616342. Pp 10. doi:10.4061/2010/616342
- Luque, J. y Herráez, A. (2002). *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud*. Harcourt. Madrid.
- Naseem, R. y Webb, M. (2008). Analysis of the DNA Binding Activity of BRCA1 and Its Modulation by the Tumour Suppressor p53. *PLoS ONE* 3(6): e2336. doi:10.1371/journal.pone.0002336
- O'Brate, A. y Giannakakou, P. (2003). The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resistance Updates* 6: 313-322.
- Ribeiro, L.; Salvadori, D. y Marques, E. (2003). *Mutagenese Ambiental*. Ed. ULBRA. Brasil. Pp. 356.
- Rodríguez, J. y Henderson, B. (2000). Identification of a Functional Nuclear Export Sequence in BRCA1. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (49): 38589-38596. DOI 10.1074/jbc.M003851200
- Scholefield, G.; Veening, J. y Murray, H. (2011). DNA-A and ORC: more than DNA replication initiators. *Trends Cell Biol*. 21: 188-194.

Scully, R.; Chen, J.; Ochs, R.; Keegan, K.; Hoekstra, M.; Feunteun, J. y Livingston, D. (1997). Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell*. 90: 425-443.

Storici, F. (2011). DNA REPAIR – On the pathways to fixing DNA damage and errors. Ed. InTech. Pp. 392. ISBN 978-953-307-649-2

Solozobova, V.; Rolletschek, A. y Blattner, C. (2009). Nuclear accumulation and activation of p53 in embryonic stem cells after DNA damage. *BMC Cell Biology*. 10:46 doi:10.1186/1471-2121-10-46

Valdiglesias, V.; Laffon, B.; Pásaro, E. y Méndez, J. (2008). Evaluación del efecto de la selenometionina sobre la reparación del daño en el ADN. *Revista Real Academia Galega de Ciencias*. 27: 41-94.

Venkitaraman, A. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*. 108 (2): 171-182.

Wang, Y.; Cortez, D.; Yazdi, P.; Neff, N.; Elledge, S. y Qin, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev*. 14: 927-939.

Wei, Z.; Lifan, J.; Jiliang, H.; Jianlin, L.; Baohong, W. y Hongping, D. (2005) Detecting DNA repair capacity of peripheral lymphocytes from cancer patients with UVC challenge test and bleomycin challenge test. *Mutagenesis*. 20: 271-277.

Wozniak, K.; Arabski, M.; Malecka-Panas, E.; Drzewoski, J. y Blasiak, J. (2004). DNA damage in human colonic mucosa cells induced by bleomycin and the protective action of vitamin E. *Cell. Mol. Biol. Lett*. 9: 31-45.

Zhang, J. y Powell, S. (2005). The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair. Review. *Mol Cancer Res*. 3 (10): 531-539.

Glosario

3MeA: 7-desoxiguanina y 3 metil adenina

ATM: Ataxia telangiectasia mutated (proteína quinasa, fosforila a otras proteínas). Controla la reparación y el ciclo celular.

ATR: Ataxia telangiectasia and Rad3 related (proteína quinasa, fosforila a otras proteínas). Controla la reparación y el ciclo celular.

BARD1: BRCA1 associated RING domain 1, proteína que se une al motivo en anillo de BRCA1 y median su ingreso al núcleo celular.

BASC: Complejo BASC (BRCA1-Associated Genome Surveillance Complex), “complejo de vigilancia genómica asociado a BRCA1”.

BER: Reparación por escisión de bases (base excision repair).

BRCT: Región C-terminal de BRCA1.

Chk2: Proteína quinasa que fosforila a otras proteínas. Regula puntos de control del ciclo celular y apoptosis.

CRM1: Chromosome region maintenance 1. Exportina que media la salida de proteínas del núcleo celular.

DDR: DNA damage repair. Reparación del daño en el ADN

DSB: Rupturas doble hebra (double-strand break).

EMS: Etil metano sulfonato, agente alquilante.

FITC: fluorescein isothiocyanate, tinción fluorescente que se utiliza ampliamente en microscopia de epifluorescencia y confocal.

G1/G2/S/M: fases del ciclo celular.

HR: Recombinación homóloga (Homologous Recombination, HR).

IP: yoduro de propidio, tinción específica de ácidos nucleicos.

MDM2: Murine doble minute 2. Regulador negativo de p53.

MMR: Reparación de emparejamientos erróneos (Mismatch Repair, MMR).

MMS: etil metano sulfonato, agente alquilante.

NER: Reparación por escisión de nucleótidos (nucleotid excision repair).

NES: Señal de exportación nuclear (NES; nuclear export signal).

NHEJ: La unión final no homóloga (Non-Homologous End Joining, NHEJ).

NLS: Señales de localización nuclear (NLS; nuclear localization signal).

SEI: Exportación independiente del estrés genético.

SSB: Rupturas simple hebra (simple strand break).

SSE: Exportación dependiente del estrés genético.

ANEXO I- El test de micronúcleos en *Ctenomys*

Durante la división celular (mitosis), el material genético se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas. Sin embargo, si ocurren errores en la replicación y/o posterior división del ADN (por encontrarse afectado el huso mitótico), si agentes genotóxicos generan rupturas, se producen pérdidas cromosómicas y el reparto de material genético no es equitativo. Las zonas del genoma que se desprenden, originan uno o varios núcleos de menor tamaño que el núcleo primario denominados micronúcleos (MN). El material genético desprendido puede derivar de cromosomas enteros (pérdida provocada por procesos aneugénicos), o más frecuentemente de fragmentos cromosómicos acéntricos (pérdida provocada por eventos clastogénicos), quedando excluidos de los núcleos primarios de las nuevas células durante la anafase mitótica (Ribeiro y cols, 2003; Zalacain y cols, 2005; Mudry y Carballo, 2006). Dado que los eritrocitos de los mamíferos no poseen núcleo, los MN pueden detectarse con facilidad y es por eso que la sangre, para el caso de los mamíferos, es el tejido más utilizado para el test de MN (Ribeiro y cols, 2003; Mudry y Carballo, 2006).

Originalmente, el test de MN se desarrolló para células de médula ósea de roedores por Schmid (1975). El uso de eritrocitos de médula ósea permite detectar daño genético reciente, en tanto que el test de MN en eritrocitos de sangre periférica revela exposición crónica a agentes mutagénicos (Ribeiro y cols, 2003; Mudry y Carballo, 2006; Udrouiu, 2006). Es importante resaltar, que los trabajos que utilizan MN como marcador molecular de daño genético en mamíferos, no analizan el rol del bazo en la remoción de eritrocitos micronucleados (Udrouiu, 2006). Un modo de saber si en la especie que elegimos como centinela hay remoción de MN, sin realizar esplenectomía, consiste en comparar la frecuencia de MN y eritrocitos con MN en sangre periférica y en médula ósea. Si el porcentaje de MN y de glóbulos rojos con MN en la médula ósea supera significativamente los porcentajes en sangre periférica, implica que el bazo está removiendo de la circulación a las células portadoras de esos fragmentos de ADN. La distribución vascular es tal vez la mayor fuente de variación en la arquitectura esplénica interespecífica. La variación en la estructura y morfología de los senos venosos forma la base de la clasificación de los bazos en dos grupos: bazos sinusales y no sinusales. Los primeros se encuentran en ratas y perros y los segundos en ratones. Los senos venosos de bazos sinusales son más grandes, más abundantes, tienen

numerosas anastomosis y una estructura característica de las paredes de dichos senos venosos en relación a los bazos no sinusales. Varios autores utilizan los términos vénulas de la pulpa en lugar de senos venosos (Cesta, 2006; Udroi, 2006). Las vénulas de la pulpa de los bazos no sinusales son pequeñas, no se anastomosan y se caracterizan por poseer un endotelio constituido por células aplanadas e irregulares, con fenestraciones fáciles de atravesar por los eritrocitos. Al contrario los senos venosos de los bazos sinusales, están constituidos por células endoteliales en forma de “barra” y hay pequeñas ranuras entre ellas donde los eritrocitos se acumulan, máxime, si un glóbulo rojo tiene una inclusión rígida como un MN (Udroi, 2006). Este tipo de bazo sinusal solo está presente en los mamíferos, ya que en el resto de los taxa, los eritrocitos poseen núcleo, lo que haría imposible la circulación de las células entre esas finas ranuras.

Esto es importante, dado que en caso de encontrar diferencias entre los porcentajes de MN y eritrocitos con MN entre la médula ósea y la sangre periférica, podríamos afirmar que en el género *Ctenomys*, el test de MN se utiliza como un marcador de daño genético relativamente reciente.

El uso de este test en animales fosoriales como *Ctenomys*, resulta más relevante aún que en mamíferos que viven sobre la superficie terrestre, dadas sus características fisiológicas especiales. La prevalencia de hipoxia e hipercapnia atmosférica, ha generado en *Ctenomys* modificaciones fisiológicas que no se encuentran en otras especies; como altas concentraciones de hemoglobina y hematocrito cuando se comparan con roedores no subterráneos (Figura 1) (Stein y cols, 2010).

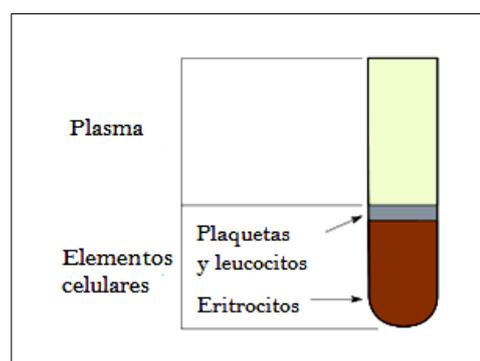


Figura 1. Procedimiento para la determinación de hematocrito

En estudios realizados en *Ctenomys lami*, se hallaron valores de hemoglobina y hematocrito más bajos que los hallados para otros roedores subterráneos que se alimentan de raíces. Al contrario de eso, los individuos del género *Ctenomys* se alimentan mayormente de las partes aéreas de los vegetales que consumen, lo que

implica una disminución a la exposición a una atmósfera rica en CO₂ y baja en O₂ ya que deben salir de sus cuevas para alimentarse (Stein y cols, 2010).

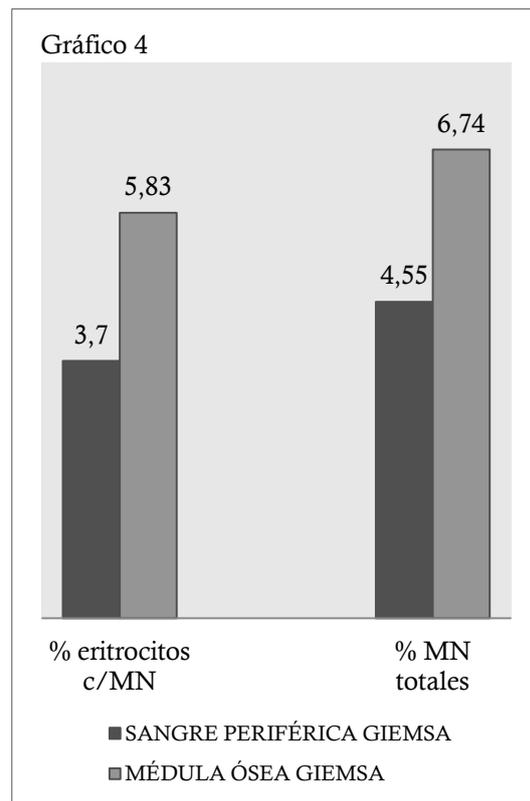
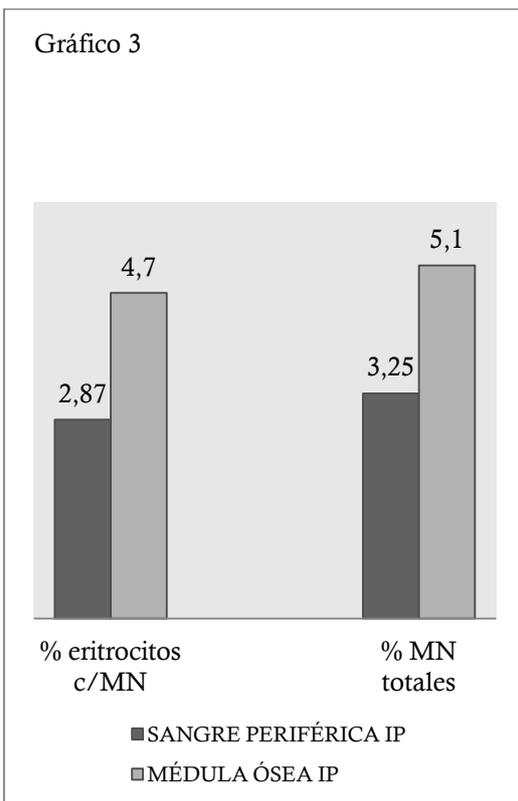
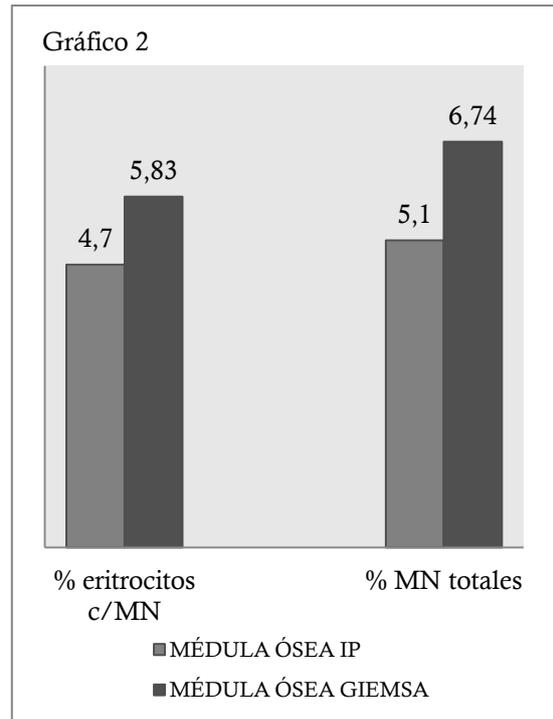
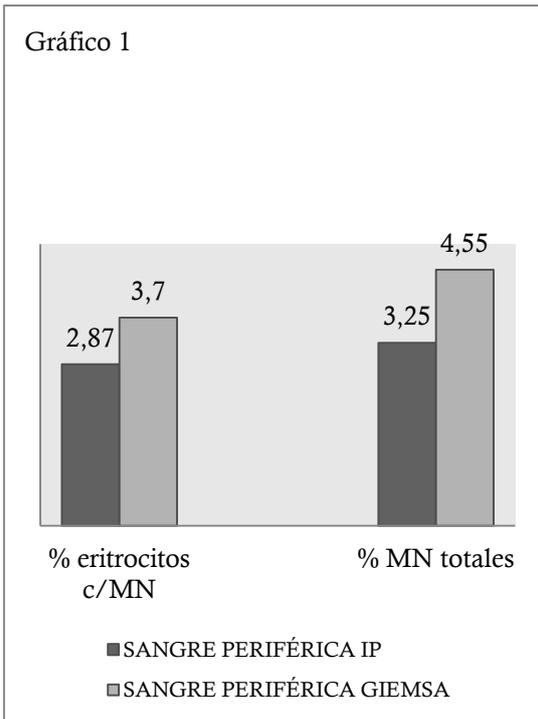
En animales que requieren un eficiente transporte de oxígeno, la presencia de MN en sus eritrocitos, afectará la capacidad de transporte de esta molécula, la concentración de eritrocitos en la sangre y por tanto, su fisiología.

Otro de los aspectos que debe considerarse cuando se realiza el test de MN, es el efecto que los diferentes procedimientos de tinción tienen sobre este ensayo. La tinción más utilizada es el Giemsa, un colorante no específico que de acuerdo a Casartelli y cols. (1997), genera falsos positivos. Nersesyan y cols. (2006) recomiendan el uso de tinciones específicas para ácidos nucleicos como el yoduro de propidio (IP) y el DAPI.

En este Anexo se pretende comparar los porcentajes de eritrocitos que presentan MN y los porcentajes de MN totales entre frotis realizados a partir de médula ósea y frotis realizados a partir de sangre periférica. A través de dicha comparación se busca determinar qué tipo de bazo tiene el género *Ctenomys*, para establecer si el test de MN detecta exposición crónica a largo plazo o exposición crónica reciente. Por otra parte, se pretenden comparar los porcentajes de eritrocitos que presentan MN y de MN totales con tinciones específicas para ácidos nucleicos y no específicas (Giemsa), para determinar si el tipo de tinción genera diferencias en los resultados obtenidos.

Se utilizaron 10 animales para cada propósito (sangre periférica y médula ósea). Siguiendo el procedimiento descrito por Fenech (2007), se realizaron los frotis para el conteo de eritrocitos y la frecuencia total de micronúcleos (MN). Se calcularon los porcentajes de eritrocitos con MN y de micronúcleos través del software Infinity Analyze™ en base al recuento de 2000 eritrocitos totales por frotis (los cuales se realizaron por duplicado y se promediaron los valores finales para cada individuo). Las frecuencias mencionadas se analizaron a través de estadística no paramétrica (Kruskall Wallis). Se utilizó el programa Statistica 6.1. Las observaciones se realizaron en microscopio de epi-fluorescencia Olympus acoplado a una cámara autoenfriada. Se utilizaron dos tipos de tinción: no específica (Giemsa) y específica para ácidos nucleicos (IP) (2 µg/ml). Se siguió el procedimiento de Nersesyan y cols. (2006), con la excepción de que se utilizó una solución de IP en agua bidestilada.

En los Gráficos 1-4 se presentan los resultados para todos los individuos analizados. Se contabilizaron la cantidad de eritrocitos con MN y la cantidad total de MN sobre la base de 2000 células por individuo y se calculó el porcentaje para cada variable. Se utilizó el análisis estadístico paramétrico (test de Student). Las diferencias en los porcentajes de eritrocitos con MN y de MN totales fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$), entre los frotis obtenidos de médula ósea y los de sangre periférica para ambas tinciones (IP y Giemsa). Las diferencias en porcentaje de eritrocitos con MN y MN totales para la comparación entre tinciones (IP o Giemsa) no resultaron estadísticamente significativas.



Porcentaje de eritrocitos con MN y porcentaje de MN totales: **Gráfico 1:** En sangre periférica, tinción con IP vs Giemsa; **Gráfico 2:** En médula ósea, tinción con IP vs Giemsa; **Gráfico 3:** En sangre periférica y médula ósea, tinción con IP y, **Gráfico 4:** En sangre periférica y médula ósea, tinción con Giemsa.

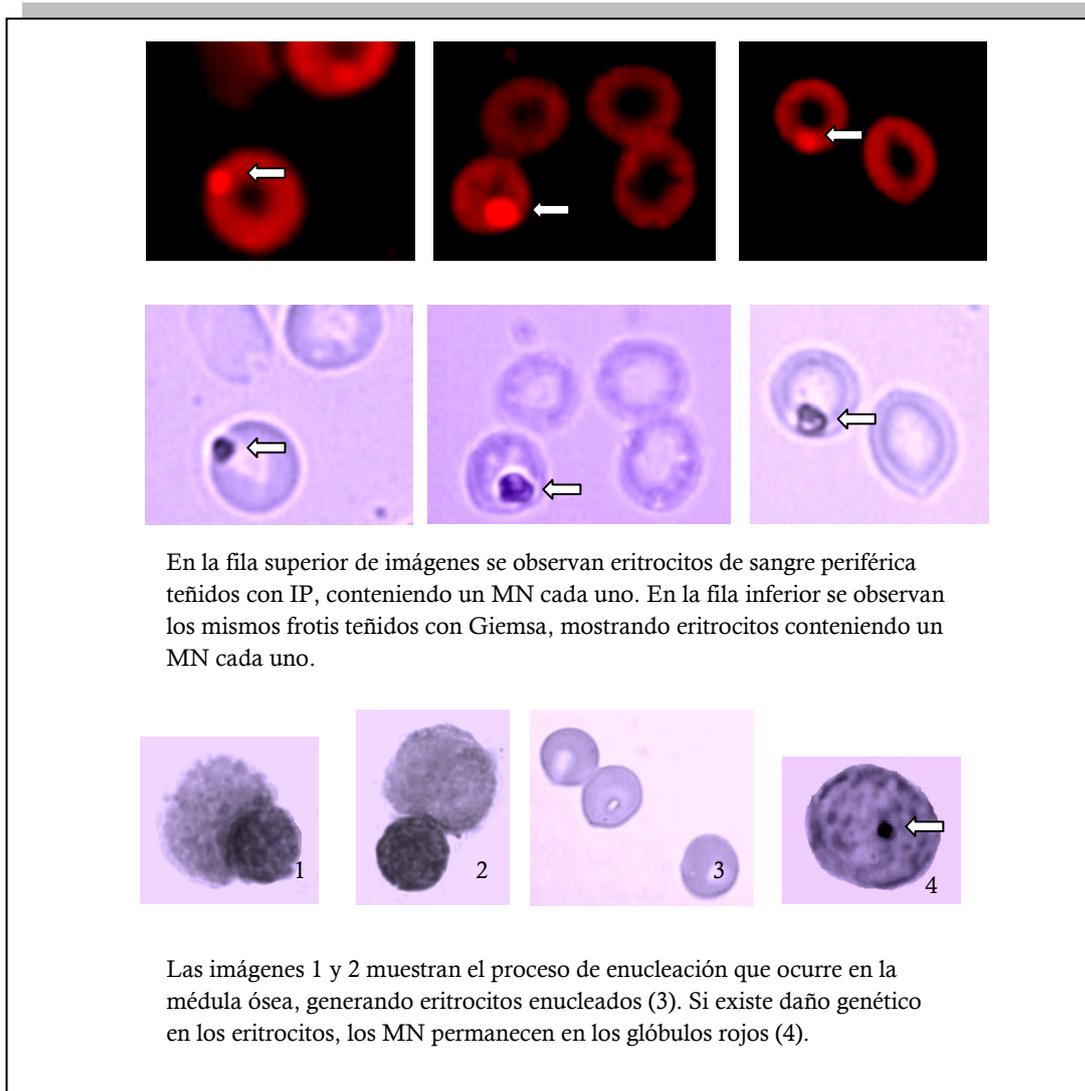


Figura 2. Las flechas en color blanco, en todos los casos señalan la presencia de un MN en eritrocitos de sangre periférica o de médula ósea (4).

Estos resultados, confirman que el bazo de las poblaciones de *Ctenomys pearsoni* utilizadas en esta tesis, son sinusales, es decir poseen senos venosos que retienen a los MN y a los eritrocitos que los contienen tal como describen para otros mamíferos Cesta (2006) y Udriou (2006). Eso implica que los individuos sometidos a agentes aneugénicos o clastogénicos, probablemente presentarán una disminución en los valores de hematocrito y hemoglobina, debido a que el bazo retirará cualquier glóbulo rojo que contenga micronúcleos. Esto coincide con los hallazgos de da Silva y cols. (2000) para *Ctenomys torquatus*, expuestos a contaminación por explotación de minas de carbón en el sur de Brasil, donde las frecuencias de eritrocitos con MN en médula ósea superaron las frecuencias de los frotis realizados a partir de sangre periférica. Esto indica que el test de MN, en estos centinelas, así como en *Canis lupus*, *Rattus norvegicus*, *Cavia porcellus*, evalúan exposición crónica reciente, dado que los glóbulos rojos que en el proceso de

enucleación (Figura 2), presenten micronúcleos secundarios serán retirados de la circulación por el bazo (Cesta, 2006; Udrouiu, 2006). Esto no ocurre en *Mus musculus*, félidos y cérvidos. En estos grupos el bazo es no sinusal, por ende los eritrocitos con MN no son retenidos en el bazo y se hallan por largos períodos en el torrente sanguíneo. Esto no invalida el uso de este test en las especies con bazos sinusales como *Ctenomys* (Udrouiu, 2006).

En relación a las técnicas de tinción, cabe destacar que no se encontraron diferencias entre las tinciones específicas para ADN-ARN y las tinciones no específicas. Si la solución de Giemsa está correctamente preparada, no precipita y si los procesos de fijación y lavado de las preparaciones se realizan en forma correcta, no deberían existir diferencias para estos tejidos. Es importante resaltar, que en donde se hallaron las mayores diferencias entre tinciones en la bibliografía revisada fue en células de la mucosa bucal (Rajeswari y cols, 2000; Nersesyan y cols, 2006) no en células sanguíneas.

Bibliografía

Casartelli, G.; Monteghirfo, S.; De Ferrari, M.; Bonatti, S.; Scala, M.; Toma, S.; Margarino, G. y Abbondandolo, A. (1997). Staining of micronuclei in squamous epithelial cells of human oral mucosa. *Anal Quant Cytol Histol*. 19 (6):475-481.

Cesta, M. (2006). Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Toxicologic Pathology*. 34: 455-465.

Cortés, E. (1997). Detección de daño en el ADN por medio de electroforesis unicelular en células de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia. Universidad Iztapalapa. Tesis de Maestría. Pp. 63.

da Silva, J.; Freitas, T.; Heuser, V.; Marinho, J. y Erdtmann, B. (2000). Genotoxicity Biomonitoring in Coal Regions Using Wild Rodent *Ctenomys torquatus* by Comet Assay and Micronucleus Test. *Environ Mol Mutag*. 35:270-278.

Fenech M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. 2 (5): 1084-1104.

Mudry, M. y Carballo M. (2006). *Genética Toxicológica*. Ed. De los 4 Vientos. Pp. 669. ISBN -13: 978-987-564-563-9. Argentina.

Nersesyan, A.; Kundi, M.; Atefie, K.; Schulte-Hermann, R. y Knasmüller, S. (2006). Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 15: 1835-1840.

Rajeswari, N.; Ahuja, Y.; Malani, U.; Chandrashekar, S.; Balakrishna, N.; Rao, K. y Khar, A. (2000). Risk assessment in the first degree female relatives of breast cancer patients using the alkaline Comet assay. *Carcinogenesis*. 21: 557-561.

Ribeiro, L.; Salvadori, D. y Marques, E. (2003). *Mutagenese Ambiental*. Ed. ULBRA. Brasil. Pp. 356.

Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutat Res*. 31: 9-15.

Stein, G.; Lacerda, L.; Hlavac, N.; Stolz, J.; Stein, I.; Freitas, T. y Carissimi, A. (2010). Parâmetros hematológicos do roedor fossorial *Ctenomys lami* (Rodentia, Ctenomidae) no estado do Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras.* 30 (8): 670-675.

Udroiu, I. (2006). Feasibility of conducting the micronucleus test in circulating erythrocytes from different mammalian species: an anatomical perspective. *Env Mol Mutag.* 47: 643-646.

Zalacain, M.; Sierrasesúmaga, L. y Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. Revisión. *Anales Sis San Navarra.* 28 (2): 227-236. ISSN 1137-6627

DISCUSIÓN GENERAL

Durante las últimas tres décadas ha aumentado el interés de la comunidad científica y de las agencias de control ambiental en relación a la detección, conocimiento y control sobre los agentes ambientales que potencialmente pueden perjudicar la salud humana y la sustentabilidad de los ecosistemas (da Silva y cols, 2003; Newman y Clements, 2008).

La biodiversidad puede definirse como el número, la variedad y la variabilidad de los organismos en una escala temporal y espacial, de un modo continuo que va desde el mayor nivel taxonómico pasando por especies, subespecies, poblaciones, subpoblaciones, individuos y genes. Los desequilibrios genéticos tienen un efecto directo sobre la biodiversidad, aumentando la susceptibilidad al estrés ambiental (da Silva y cols, 2003). Si bien la extinción, como la evolución son parte de la historia de la vida en la Tierra, la destrucción acelerada de hábitats naturales por prácticas agrícola-ganaderas, contaminación física y química, ha provocado un aumento entre 10 y 100 veces en la extinción de especies (da Silva y cols, 2003; Newman y Clemens, 2008).

Aunque mucha bibliografía apoya el uso de biomarcadores de genotoxicidad *in vivo* e *in vitro* (da Silva y cols, 2003; Ribeiro y cols, 2003; Mudry y Carballo, 2006), abriendo un nuevo campo de análisis para la contaminación ambiental, el biomonitorio y la gestión de los recursos naturales; es importante destacar que para los estudios ambientales, la información que proporcionan estos marcadores deben enmarcarse en trabajos multidisciplinarios. El uso de centinelas ambientales (Silva y cols. 2000a, 2000b; da Silva y cols, 2003; Ribeiro y cols, 2003; Mudry y Carballo, 2006) ha generado mucha información invaluable en relación al impacto que ciertos contaminantes o la mezcla de ellos tienen sobre organismos, poblaciones o comunidades a nivel genético. Sin embargo, solo pueden interpretarse a la luz de otros datos que provienen de diversas disciplinas como Ecología, Oceanografía, Limnología, Evolución, entre otras. La elección de un centinela debe basarse en cierto caudal de conocimientos sobre el grupo elegido, no es posible utilizar centinelas cuyo estatus específico es desconocido, sin haber realizado un test de validación por ejemplo (Stambuk y cols, 2008). De lo contrario, podríamos estar interpretando variaciones en las respuestas genéticas a los agentes ambientales, sin considerar que tal vez, especies diferentes aún dentro de un mismo género, respondan de forma distinta frente a un mismo mutágeno. En este sentido, la Genética de poblaciones aporta valiosa información. Por otra parte, mucha de la bibliografía existente en el área

de la Genética Toxicológica o en el monitoreo ambiental se limita a brindar aportes sobre poblaciones de individuos que presentan daño genético para uno o más marcadores, sin analizar en profundidad cuál o cuáles son las fuentes de contaminación. Otros investigadores, determinan parámetros físico-químicos de forma exhaustiva y predicen posibles efectos sobre las comunidades, sin embargo, la presencia de un contaminante no implica susceptibilidad de un organismo a él. A veces incluso, sustancias aparentemente inocuas, pueden resultar sumamente perjudiciales para el organismo una vez metabolizadas (como los compuestos de nitrógeno cuando se transforman en nitrosaminas dentro del organismo) (Newman, y Clements, 2008).

Este trabajo pretendió abordar la caracterización ambiental de un ecosistema utilizando herramientas de la Genética Toxicológica, intentando vincularlas con variables ambientales que explicaran los valores hallados, para evitar el uso de herramientas de genotoxicidad que identifican la presencia de contaminantes mutagénicos, pero no indagan en sus causas, lo que genera un aporte muy pobre a la hora de proponer medidas de mitigación.

La relación entre el daño genético observado y cuantificado en *Ctenomys in situ* y en *Allium in vitro*, se vincularía de acuerdo a los datos estadísticos con la descarga de efluentes domésticos líquidos en Playa Penino, alterando el ecosistema y poniendo en riesgo la salud de los habitantes de dicha zona, que carecen de saneamiento y cuyo suministro de agua proviene de pozos cercanos a letrinas y fosas sépticas. Cuando los datos de daño genético se comparan con una zona que presenta saneamiento y conexión a agua potable suministrada por la empresa Obras Sanitarias del Estado (OSE), se constatan diferencias significativas para ambos marcadores de daño genético (ensayo cometa y test de MN) entre Playa Penino y Carrasco sur, presentándose valores sensiblemente más altos en Playa Penino.

Los linfocitos provenientes de individuos de ambas poblaciones utilizadas en los ensayos en campo (*in situ*) fueron tratados con los mismos mutágenos y respondieron reparando el daño en lapsos de tiempo similares. Los experimentos de inmunocitoquímica demostraron que dos de las proteínas más importantes en la regulación del ciclo celular y la reparación del ADN (Rodríguez y Henderson, 2000; O'Brate y Giannakakou, 2003; Naseem y Webb, 2008) actúan de acuerdo a lo esperado, en estas poblaciones. Esto indicaría que las diferencias *in situ*, observadas entre Playa Penino y Carrasco sur se deben a la influencia de contaminantes ambientales en el primer sitio.

El estudio detallado de la médula ósea y la sangre periférica en *Ctenomys* para el test de micronúcleos, confirmó los datos obtenidos para otra especie de *Ctenomys* (Heuser y cols, 2002), que demuestran que estos individuos remueven activamente estos núcleos secundarios del torrente sanguíneo.

Conclusiones

- ✓ Los marcadores de daño genético (test de micronúcleos, ensayo cometa, *Allium* test) revelaron la existencia de agentes mutagénicos en Playa Penino.
- ✓ Los parámetros físico-químicos y microbiológicos analizados en Playa Penino indican que la principal fuente de contaminación es la descarga de efluentes cloacales.
- ✓ Los análisis para presencia de agroquímicos en esa área fueron negativos.
- ✓ El humedal de Playa Penino, funciona como un depurador de las aguas servidas hasta el momento, lo que no implica que la población humana esté exenta de riesgo sanitario. La existencia de pozos sépticos en las cercanías de los pozos de agua para consumo sin el control y la profundidad adecuados, así como la descarga directa de los efluentes cloacales a las cunetas, representan una grave amenaza para la población del lugar.
- ✓ Los beneficios del saneamiento se evidencian en el aumento de daño genético constatado en Playa Penino respecto a Carrasco sur.
- ✓ A pesar de las diferencias a nivel citogenético que existen entre la población de Playa Penino ($2n=70$) y la Población de Playa Carrasco ($2n=58$), los linfocitos de ambas poblaciones repararon el daño genético provocado por agentes mutagénicos potentes en tiempos similares.
- ✓ Las proteínas BRCA1 y p53 (junto con las demás proteínas que forman parte de las distintas vías de reparación existentes), subsanaron eficientemente el daño provocado por la bleomicina y el MMS en las células de ambas poblaciones.

- ✓ El ensayo de micronúcleos realizado sobre frotis de médula ósea y de sangre periférica demostró que el bazo de esta especie es sinusal y remueve activamente MN de la sangre.
- ✓ *Ctenomys* demostró ser un adecuado centinela ambiental, ya que los datos aportados por los marcadores moleculares de daño celular y genético se asociaron estadísticamente con los parámetros físico-químicos analizados.

Perspectivas

- ✓ Playa Penino presenta problemas de contaminación por aguas servidas, aún siendo un área declarada “ecológica” por lo que es apremiante la implementación de medidas de gestión que tiendan a minimizar el impacto de las descargas de efluentes domésticos líquidos: 1. La salud de la población local está en serio riesgo o ya se encuentra afectada; 2. Como varios autores reportan la biodiversidad disminuye. Los organismos estatales que tienen competencia sobre esa zona deben asegurar acceso a fuentes de agua potable que cumplan con los estándares, controlar la extracción de arena, regular los asentamientos y establecer un plan de saneamiento que minimice los impactos sobre el humedal (DINAMA, MGAP, MDN (Prefectura Nacional Naval), IMSJ, MSP).
- ✓ Sería un aporte importante confirmar los datos obtenidos para las variables ambientales, la ampliación del muestreo físico-químico y microbiológico **utilizando** muestras simples que incluyan mediciones de materia orgánica a través de variables como demanda biológica de oxígeno, demanda química de oxígeno.
- ✓ El abordaje multidisciplinario de los problemas ambientales, genera información que no solo se agota en el diagnóstico sino que hace posible la propuesta de medidas tendientes a mejorar la gestión de las áreas estudiadas, desde aspectos que pocas veces se asociaban tan directamente como en la actualidad; la salud humana y la salud ecosistémica.

- ✓ Los datos relacionados con la cinética de reparación y la localización de BRCA1 y p53 concuerdan con la bibliografía, en las poblaciones de *Ctenomys* analizadas. A nivel evolutivo, sería interesante analizar esos parámetros en otras especies uruguayas y comprobar si, efectivamente, dichas proteínas actúan a nivel mitocondrial, utilizando marcadores específicos para mitocondrias (mitotracker) y para componentes del citoesqueleto (marcadores de actina y tubulina). De este modo, se aportarían datos sobre el movimiento intracelular de estas proteínas en respuesta al daño genético y al funcionamiento de la maquinaria de reparación en cada especie del género *Ctenomys* en Uruguay.

- ✓ La alteración en la variabilidad genética y las frecuencias alélicas causadas por la acción de agentes ambientales en poblaciones naturales, debe comenzar a estudiarse con detalle, en una nueva disciplina que hoy se conoce como Toxicología Evolutiva, especialmente en poblaciones cuyo hábitat se encuentra fragmentado.

Bibliografía

- da Silva, J.; Erdtmann, B. y Henriques, J. (2003). *Genética Toxicológica*. Ed. Alcance. Brasil. Pp. 422.
- Mudry, M. y Carballo, M. (2006). *Genética Toxicológica*. Ed. De los Cuatro Vientos. Argentina. Pp. 669.
- Naseem, R. y Webb, M. (2008). Analysis of the DNA Binding Activity of BRCA1 and Its Modulation by the Tumour Suppressor p53. *PLoS ONE* 3(6): e2336.
doi:10.1371/journal.pone.0002336
- Newman, M. y Clements, W. (2008). *Ecotoxicology: a comprehensive treatment*. CRC Press. Pp. 852.
- Ribeiro, L.; Salvadori, D. y Marques, E. (2003). *Mutagenese Ambiental*. Ed. ULBRA. Brasil. Pp. 356.
- Rodríguez, J. y Henderson, B. (2000). Identification of a Functional Nuclear Export Sequence in BRCA1. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (49): 38589–38596. DOI 10.1074/jbc.M003851200
- Silva, J.; Freitas, T.; Heuser, V.; Marinho, J.; Bittencourt, F.; Cerski, C.; Klassmann, L. y Erdtmann, B. (2000a). Chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated with multiple methods and tissues. *Mutat. Res.* 470 (1): 39-51.
- Silva, J.; Freitas, T.; Heuser, V.; Marinho, J. y Erdtmann, B. (2000b). Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by comet assay and micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (4): 270-278.
- Stambuk, A.; Pavlica, M.; Malovic, L. y Klobucar, G. (2008). Persistence of DNA Damage in the Freshwater Mussel *Unio pictorum* Upon Exposure to Ethyl Methanesulphonate and Hydrogen Peroxide. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49:217-225.
- Naseem, R. y Webb, M. (2008). Analysis of the DNA Binding Activity of BRCA1 and Its Modulation by the Tumour Suppressor p53. *PLoS ONE* 3(6): e2336.
doi:10.1371/journal.pone.0002336
- O'Brate, A. y Giannakakou, P. (2003). The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resistance Updates* 6: 313–322.