

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“ESTUDIO DEL POTENCIAL GENOTÓXICO DE AGUAS DEL RÍO
PARANÁ MEDIANTE ENSAYO COMETA Y MICRONÚCLEOS *IN VIVO* E
IN VITRO”**

Lic. Jacqueline Diana Caffetti

**Director: Dr. Alberto Sergio Fenocchio
Co-Directora: Dra. María de los Ángeles Bistoni**

**Laboratorio de Citogenética General
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales
Universidad Nacional de Misiones (UNaM-IBS-CONICET)**



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

Córdoba, Argentina

2014

COMISIÓN ASESORA

Dra. María Valeria Amé, CIBICI-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba.

Dr. Héctor Ramón Rubinstein, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Dr. Alberto Sergio Fenocchio, UNaM-IBS-CONICET, Universidad Nacional de Misiones.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
INTRODUCCIÓN	1
I. Marco General.....	2
II. Ambiente Acuático y Contaminación Antrópica	4
III. Río Paraná.....	7
IV. Genética Toxicológica Ambiental.....	10
V. Genotoxicidad, Mutagénesis, Carcinogénesis.....	12
VI. Toxicocinética y Toxicodinamia.....	14
VII. Monitoreo Biológico, Bioindicadores, Bioensayos y Biomarcadores.....	16
VIII. Ensayos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> en Estudios de Genética Toxicológica y Monitoreo Ambiental	17
IX. Peces y Moluscos como Modelos Bioindicadores.....	18
IX.1. <i>Steindachnerina brevipinna</i> (Eigenmann & Eigenmann, 1889).....	21
IX.2. <i>Corbicula fluminea</i> (Müller, 1774).....	22
IX.3. <i>Limnoperna fortunei</i> (Dunker, 1857).....	23
X. Células CHO-K1 como Modelo <i>In vitro</i> en Ensayos de Genética Toxicológica	24
XI. Ensayo Cometa	25
XII. Test de Micronúcleos y Alteraciones de la Morfología Nuclear	28
XIII. Relevancia del Uso de Biomarcadores Genéticos y Organismos Indicadores en Programas de Monitoreo Ambiental y Control de Efluentes.....	30
Hipótesis y Objetivos	34
MATERIALES Y MÉTODOS	36
I. Sitios y Épocas de Muestreo	37
I.1. Iguazú.....	37
I.2. Puerto Piray	37
I.3. Puerto Mineral.....	38
I.4. Posadas	38
II. Análisis Físicoquímicos	40
III. Ensayos <i>in vivo</i>	43

III.1. Material Biológico	43
III.1.1. <i>Corbicula fluminea</i> (Müller, 1774) o “almeja asiática”	43
III.1.2. <i>Limnoperna fortunei</i> (Dunker, 1857) o “mejillón dorado”	43
III.1.3. <i>Steindachnerina brevipinna</i> (Eigenmann & Eigenmann, 1889) o “sabalito” ..	44
III.2. Diseño Experimental	44
III.2.1. Detoxificación de los ejemplares.....	44
III.2.2. Bioensayos de exposición y controles.....	44
III.2.3. Obtención de las muestras biológicas.....	46
III.3. Ensayo de recuperación de daños.....	46
IV. Ensayos <i>in vitro</i>	48
IV.1. Material Biológico.....	48
IV.2. Diseño Experimental.....	48
IV.2.1. Condiciones para el cultivo celular	48
IV.2.2. Pretratamiento y estabilización celular	48
IV.2.3. Tratamientos y controles	49
V. Protocolo del Ensayo Cometa	51
VI. Protocolo del Test de Micronúcleos y Alteraciones de la Morfología Nuclear	53
VI.1. Ensayos <i>in vivo</i>	54
VI.1.1. <i>Corbicula fluminea</i> y <i>Limnoperna fortunei</i>	54
VI.1.2.- <i>Steindachnerina brevipinna</i>	55
VI.2.- Ensayos <i>in vitro</i>	56
VI.2.1. Cultivo de células CHO-K1	56
VI.3.- Criterios para el recuento de Micronúcleos	57
VI.4.- Clasificación de las Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN)	57
VII. Análisis Estadísticos	58
RESULTADOS	62
I. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA	63
II. ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	72
<i>Corbicula fluminea</i> (Müller, 1774)	73
Ensayo Cometa	74
Test de Micronúcleos y Alteraciones de la Morfología Nuclear	76
<i>Limnoperna fortunei</i> (Dunker, 1857)	84

Ensayo Cometa	84
Test de Micronúcleos y Alteraciones de la Morfología Nuclear	88
<i>Steindachnerina brevipinna</i> (Eigenmann & Eigenmann, 1889).....	94
Ensayo Cometa	95
Test de Micronúcleos y Alteraciones de la Morfología Nuclear	98
Evaluación del Estrés Ocasionado por la Manipulación de los Individuos	102
Ensayo Cometa	102
Test de Micronúcleos y Alteraciones de la Morfología Nuclear	104
III. ENSAYOS DE RECUPERACIÓN DE DAÑOS	106
Ensayo Cometa	107
Test de Micronúcleos y Alteraciones de la Morfología Nuclear	110
IV. ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	121
Células CHO-K1	122
Ensayo Cometa	122
Test de Micronúcleos y Alteraciones de la Morfología Nuclear	124
V. ANÁLISIS GENERAL	129
Ensayo Cometa	131
Test de Micronúcleos y Alteraciones de la Morfología Nuclear	133
DISCUSIÓN	141
I. CARACTERÍSTICAS DEL AREA DE ESTUDIO Y SU RELACIÓN CON LOS EFECTOS GENOTÓXICOS.....	142
I.1. Puerto Piray y Puerto Mineral.....	142
I.2. Iguazú y Posadas.....	146
II. VARIACIONES TEMPORALES DE LOS BIOMARCADORES Y SU RELACIÓN CON LOS ÍNDICES DE CALIDAD DE AGUA.....	148
III. ENSAYOS <i>IN VIVO</i>.....	151
III.1. Variaciones en los Biomarcadores asociadas a los Tiempos de Exposición.....	151
III.2. Variaciones en los Biomarcadores asociadas a los distintos tipos de Hemocitos en Bivalvos	153
III.3. Ensayos de Recuperación de Daños: Capacidad de Reparación del ADN y posibles Respuestas Adaptativas.....	155
IV. ENSAYOS <i>IN VITRO</i>: ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE LOS BIOMARCADORES EN CÉLULAS CHO-K1..	157
V. ANÁLISIS GENERAL	159

VI. CONSIDERACIONES FINALES.....	161
CONCLUSIONES	164
BIBLIOGRAFÍA	168
ANEXOS	192
Anexo I	193
Anexo II	195
Anexo III	196
Anexo IV	208

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del área de estudio donde se localizan los sitios de muestreo sobre el Río Paraná en la provincia de Misiones	39
Figura 2. Variación de los niveles y caudales del Río Paraná durante 2009-2011.....	65
Figura 3. Índices de Calidad de Agua (ICA) entre los diferentes sitios de muestreo durante los años 2009-2011.....	69
Figura 4. Área de picos para compuestos orgánicos presentes en las distintas muestras de agua del Río Paraná	71
Figura 5. Ejemplar de <i>Corbicula fluminea</i> Vista externa e interna de ambas valvas.....	73
Figura 6. Índices medios de daño en el ADN de hemocitos de <i>C. fluminea</i> detectados mediante Ensayo Cometa luego de tres días de exposición a muestras de agua del río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011	75
Figura 7. Índices medios de daño en el ADN (ID ± DE) de hemocitos de <i>C. fluminea</i> detectados mediante Ensayo Cometa luego de diez días de exposición a muestras de agua del río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011	75
Figura 8. Lesiones en el ADN de células de hemolinfa de <i>C. fluminea</i> detectadas mediante ensayo cometa luego de tratamientos con aguas del río Paraná.....	76
Figura 9. Células en extendidos de hemolinfa de <i>C. fluminea</i> luego de tratamientos con aguas del río Paraná	78
Figura 10. Frecuencias de MN en granulocitos de hemolinfa de <i>C. fluminea</i> luego de tres y diez días de exposición a muestras de agua del río Paraná	79
Figura 11. Frecuencias de MN en hialinocitos de hemolinfa de <i>C. fluminea</i> luego de tres y diez días de exposición a muestras de agua del río Paraná	80
Figura 12. Frecuencias de hialinocitos binucleados y trinucleados estimadas en función del total de hemocitos contabilizados por tratamiento con muestras de agua del río Paraná.....	81
Figura 13. Frecuencias de Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en granulocitos de <i>C. fluminea</i> expuestos durante tres y diez días a muestras de agua del río Paraná.....	82

Figura 14. Porcentajes de distribución de los tipos de AMN encontradas en granulocitos de hemolinfa de <i>C. fluminea</i> luego de tres y diez días de exposición a los tratamientos con muestras de agua del río Paraná.....	83
Figura 15. Ejemplar de <i>Limnoperna fortunei</i> . Vista externa e interna de valva derecha	84
Figura 16. Índices medios de daño en el ADN de hemocitos de <i>L. fortunei</i> detectados mediante Ensayo Cometa luego de tres días de exposición a muestras de agua del río Paraná.....	86
Figura 17. Índices medios de daño en el ADN de hemocitos de <i>L. fortunei</i> detectados mediante Ensayo Cometa luego de diez días de exposición a muestras de agua del río Paraná	87
Figura 18. Lesiones en el ADN de células de hemolinfa de <i>L. fortunei</i> detectadas mediante ensayo cometa luego de tratamientos con aguas del río Paraná.....	87
Figura 19. Células extendidas de hemolinfa de <i>L. fortunei</i> luego de tratamientos con aguas del río Paraná	89
Figura 20. Frecuencias de MN en granulocitos de hemolinfa de <i>L. fortunei</i> luego de tres y diez días de exposición a muestras de agua del río Paraná	90
Figura 21. Frecuencias de MN en hialinocitos de hemolinfa de <i>L. fortunei</i> luego de tres y diez días de exposición a muestras de agua del río Paraná	90
Figura 22. Frecuencias de hialinocitos binucleados, trinucleados y tetranucleados estimadas en función del total de hemocitos contabilizados por tratamiento con muestras de agua del río Paraná	91
Figura 23. Frecuencias de Alteraciones de la Morfología Nuclear en granulocitos de <i>L. fortunei</i> expuestos durante tres y diez días a muestras de agua del río Paraná	92
Figura 24. Porcentajes de distribución de los tipos de AMN encontradas en granulocitos de hemolinfa de <i>L. fortunei</i> luego de tres días de exposición y diez días de exposición a los tratamientos con muestras de agua del río Paraná.....	93
Figura 25. Vista lateral de ejemplar de <i>Steindachnerina brevipinna</i>	94
Figura 26. Índices medios de daño en el ADN de eritrocitos de <i>S. brevipinna</i> detectados mediante Ensayo Cometa luego de tres días de exposición a muestras de agua del río Paraná ..	96

Figura 27. Índices medios de daño en el ADN de eritrocitos de <i>S. brevipinna</i> detectados mediante Ensayo Cometa luego de diez días de exposición a muestras de agua del río Paraná..	96
Figura 28. Lesiones en el ADN de células de hemolinfa de <i>S. brevipinna</i> detectadas mediante ensayo cometa luego de tratamientos con aguas del río Paraná	97
Figura 29. Frecuencias de Micronúcleos en eritrocitos de <i>S. brevipinna</i> expuestos durante tres y diez días a muestras de agua del río Paraná	98
Figura 30. Frecuencias de Alteraciones de la Morfología Nuclear en eritrocitos de <i>S. brevipinna</i> expuestos durante tres y diez días a muestras de agua del río Paraná	99
Figura 31. Porcentajes de distribución de los tipos de AMN encontradas en eritrocitos de <i>S. brevipinna</i> luego de tres días de exposición y diez días de exposición a los tratamientos con muestras de agua del río Paraná.....	100
Figura 32. Alteraciones nucleares obtenidas mediante el test de MN y AMN en eritrocitos de <i>S. brevipinna</i> luego de la exposición con aguas del río Paraná	101
Figura 33. Evaluación del estrés generado por repetidas extracciones de hemolinfa en el análisis de índices de daño en el ADN.....	103
Figura 34. Evaluación del estrés generado por repetidas extracciones de sangre en el análisis de índices de daño en el ADN.....	103
Figura 35. Evaluación del estrés generado por repetidas extracciones de hemolinfa mediante la comparación de frecuencias de micronúcleos (MN) y alteraciones de la morfología nuclear (AMN) en hialinocitos y granulocitos de <i>C. fluminea</i>	104
Figura 36. Evaluación del estrés generado por repetidas extracciones de sangre en <i>S. brevipinna</i> mediante la comparación de frecuencias de micronúcleos y alteraciones nucleares.....	105
Figura 37. Ensayos de recuperación de daños en el ADN de hemocitos de <i>C. fluminea</i> previamente expuestos durante tres y diez días a muestras de agua del río Paraná, evaluados mediante ensayo cometa.....	108
Figura 38. Ensayos de recuperación de daños en el ADN de hemocitos de <i>L. fortunei</i> previamente expuestos durante tres y diez días a muestras de agua del río Paraná, evaluados mediante ensayo cometa.....	108

Figura 39. Ensayos de recuperación de daños en el ADN de eritrocitos de <i>S. brevipinna</i> previamente expuestos durante tres y diez días a muestras de agua del río Paraná, evaluados mediante ensayo cometa.....	109
Figura 40. Ensayos de recuperación de daños en el ADN de granulocitos de <i>C. fluminea</i> luego de bioensayos de tres y diez días de exposición a muestras de agua del río Paraná, evaluados mediante test de MN	111
Figura 41. Ensayos de recuperación de daños en el ADN de hialinocitos de <i>C. fluminea</i> luego de bioensayos de tres y diez días de exposición a muestras de agua del río Paraná, evaluados mediante test de MN	112
Figura 42. Frecuencias de hialinocitos binucleados y trinucleados en hemolinfa de <i>C. fluminea</i> luego de ensayos de recuperación de daños en el ADN para tratamientos con muestras de agua del río Paraná.....	113
Figura 43. Ensayos de recuperación de daños en el ADN de granulocitos de <i>L. fortunei</i> luego de bioensayos de tres y diez días de exposición a muestras de agua del río Paraná, evaluados mediante test de MN	114
Figura 44. Ensayos de recuperación de daños en el ADN de hialinocitos de <i>L. fortunei</i> luego de bioensayos de tres y diez días de exposición a muestras de agua del río Paraná, evaluados mediante test de MN	115
Figura 45. Frecuencias de hialinocitos binucleados y trinucleados en extendidos de hemolinfa de <i>L. fortunei</i> luego de ensayos de recuperación de daños en el ADN para tratamientos con muestras de agua del río Paraná.....	116
Figura 46. Ensayos de recuperación de daños en el ADN de eritrocitos de <i>S. brevipinna</i> luego de bioensayos de tres días de exposición a muestras de agua del río Paraná, evaluados mediante test de MN.....	117
Figura 47. Ensayos de recuperación de daños en el ADN de eritrocitos de <i>S. brevipinna</i> luego de bioensayos de diez días de exposición a muestras de agua del río Paraná, expresados como frecuencias de AMN	118
Figura 48. Células CHO-K1 en cultivo de adherencia	122
Figura 49. Índices de daño en el ADN de células CHO-K1 evaluados mediante ensayo cometa luego de 2 hs de exposición a muestras de agua del río Paraná	123

Figura 50. Lesiones en el ADN detectadas mediante ensayo cometa en células CHO-K1 expuestas <i>in vitro</i> a tratamientos con aguas del río Paraná	124
Figura 51. Frecuencias de Micronúcleos en células CHO-K1 expuestas <i>in vitro</i> a tratamientos con aguas del río Paraná	125
Figura 52. Frecuencias de Alteraciones de la Morfología Nuclear en células CHO-K1 expuestas <i>in vitro</i> a tratamientos con aguas del río Paraná	126
Figura 53. Extendidos de células CHO-K1 analizados mediante test de MN y AMN luego de tratamientos <i>in vitro</i> con aguas del río Paraná	127
Figura 54. Distribución de los tipos de AMN encontradas en células CHO-K1 entre los distintos tratamientos realizados <i>in vitro</i> con aguas del río Paraná.....	127
Figura 55. Índices mitóticos calculados en células CHO-K1 expuestas a tratamientos con aguas del río Paraná	128
Figura 56. Índice de Calidad de Agua general promedio estimado para todo el periodo de estudio (2009-2011) en cada sitio de muestreo sobre el Río Paraná	130
Figura 57. Índices de daño en el ADN detectados mediante ensayo cometa en las especies <i>Corbicula fluminea</i> , <i>Limnoperna fortunei</i> , <i>Steindachnerina brevipinna</i> y células CHO-K1 luego de ensayos agudos con muestras de agua del río Paraná	131
Figura 58. Índices de daño en el ADN detectados mediante ensayo cometa en las especies <i>Corbicula fluminea</i> , <i>Limnoperna fortunei</i> y <i>Steindachnerina brevipinna</i> expuestas durante 10 días a muestras de agua del río Paraná	133
Figura 59. Frecuencias de Micronúcleos en hemocitos (hialinocitos y granulocitos) de <i>Corbicula fluminea</i> y <i>Limnoperna fortunei</i> ; eritrocitos de <i>Steindachnerina brevipinna</i> y células CHO-K1 luego de tratamientos agudos con aguas del río Paraná.....	134
Figura 60. Frecuencias de Micronúcleos en hemocitos (hialinocitos y granulocitos) de <i>Corbicula fluminea</i> , <i>Limnoperna fortunei</i> y eritrocitos de <i>Steindachnerina brevipinna</i> luego de tratamientos de diez días con aguas del río Paraná	135
Figura 61. Frecuencias de Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en granulocitos de <i>Corbicula fluminea</i> y <i>Limnoperna fortunei</i> ; eritrocitos de <i>Steindachnerina brevipinna</i> y células CHO-K1 luego de tratamientos agudos con aguas del río Paraná	136

Figura 62. Frecuencias de Micronúcleos en granulocitos de <i>Corbicula fluminea</i> , <i>Limnoperna fortunei</i> y eritrocitos de <i>Steindachnerina brevipinna</i> luego de tratamientos de diez días con aguas del río Paraná	136
Figura 63. Gráfico de dispersión y líneas de tendencias entre índices de daño en el ADN detectados mediante ensayo cometa en diversos modelos biológicos e índices de calidad de agua de los sitios de muestreo al que fueron expuestos en ensayos agudos	137
Figura 64. Gráfico de dispersión y líneas de tendencias entre índices de daño en el ADN detectados mediante ensayo cometa en diversos modelos biológicos e índices de calidad de agua de los sitios de muestreo al que fueron expuestos durante diez días.	138
Figura 65. Gráfico de dispersión y líneas de tendencias entre frecuencias de micronúcleos en diversos modelos biológicos e índices de calidad de agua de los sitios de muestreo al que fueron expuestos en ensayos agudos.	139
Figura 66. Gráfico de dispersión y líneas de tendencias entre frecuencias de micronúcleos en diversos modelos biológicos e índices de calidad de agua de los sitios de muestreo al que fueron expuestos durante diez días.	139
Figura 67. Gráfico de dispersión y líneas de tendencias entre frecuencias de alteraciones de la morfología nuclear en diversos modelos biológicos e índices de calidad de agua de los sitios de muestreo al que fueron expuestos en ensayos agudos.	140
Figura 68. Gráfico de dispersión y líneas de tendencias entre frecuencias de alteraciones de la morfología nuclear en diversos modelos biológicos e índices de calidad de agua de los sitios de muestreo al que fueron expuestos durante diez días.	140

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos analizados en las muestras de agua del Río Paraná correspondientes al año 2009	67
Tabla II. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos analizados en las muestras de agua del Río Paraná correspondientes al año 2010	67
Tabla III. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos analizados en las muestras de agua del Río Paraná correspondientes al año 2011	68
Tabla IV. Descriptores de calidad del agua	70
Tabla V. Longitud total media de los ejemplares de <i>C. fluminea</i> empleados durante el periodo de estudio (2009-2011).....	73
Tabla VI. Longitud total media de los ejemplares de <i>L. fortunei</i> empleados durante todo el periodo de estudio (2009-2011).....	84
Tabla VII. Longitud media de los ejemplares de <i>S. brevipinna</i> empleados durante todo el período de estudio (2009-2011)	94
Tabla VIII. Porcentajes de reducción en los índices de daño en el ADN luego de los ensayos de recuperación posteriores a tratamientos con aguas del río Paraná durante 3 y 10 días de exposición.....	110
Tabla IX. Porcentajes de reducción en las frecuencias de micronúcleos de granulocitos y hialinocitos de bivalvos luego de los ensayos de recuperación de daños en el ADN posteriores a tratamientos con aguas del río Paraná durante 3 y 10 días de exposición	119
Tabla X. Porcentajes de reducción en las frecuencias de alteraciones de la morfología nuclear de granulocitos de bivalvos luego de los ensayos de recuperación de daños en el ADN posteriores a tratamientos con aguas del río Paraná durante 3 y 10 días de exposición	119
Tabla XI. Porcentajes de reducción en las frecuencias de micronúcleos y alteraciones de la morfología nuclear de eritrocitos de <i>S. brevipinna</i> luego de los ensayos de recuperación de daños en el ADN posteriores a tratamientos con aguas del río Paraná durante 3 y 10 días de exposición	

RESUMEN

Los ambientes acuáticos han sido objeto de atención en los últimos años debido al incremento en las sustancias contaminantes que ingresan a través de efluentes de origen industrial, urbano y agrícola. Tal es la situación del río Paraná que atraviesa extensas áreas urbanas en su recorrido y en su ingreso a territorio argentino recibe en la provincia de Misiones los efluentes de tres industrias de celulosa y papel como también el aporte de desechos urbanos para los cuales muy pocas localidades de la provincia cuentan con plantas de tratamiento. En el presente trabajo se propuso evaluar el potencial genotóxico de aguas del Río Paraná provenientes del tramo que atraviesa la provincia de Misiones durante el periodo 2009-2011 aplicando los ensayos cometa (EC), de micronúcleos (MN) y alteraciones de la morfología nuclear (AMN) *in vivo*, mediante bioensayos con las especies *Corbicula fluminea*, *Limnoperna fortunei* y *Steindachnerina brevipinna* e *in vitro* con células CHO-K1 expuestas a muestras de agua colectadas en los sitios: Iguazú, Puerto Piray, Puerto Mineral y Posadas. Diez ejemplares de cada especie fueron expuestos durante 3 y 10 días; en tanto las células CHO-K1 fueron tratadas durante 2 hs (EC) y 15 hs (MN y AMN). Se realizaron controles negativos y positivos, se analizó la recuperación de daños durante 5, 10 y 15 días y se calculó el índice de calidad del agua (ICA) de cada sitio, siendo detectados efectos genotóxicos en todos los casos. Las muestras de agua de Piray y Mineral promovieron los mayores niveles de daño detectado con ambas técnicas, pero sólo en Piray las diferencias fueron significativas para todos los modelos biológicos. Las muestras procedentes de Posadas e Iguazú indujeron menor daño. Mezclas complejas de efluentes papeleros y urbanos generarían daños directos potencialmente reparables así como explicarían otros efectos genotóxicos clastogénicos y aneugénicos observados. Los tratamientos agudos denotan mayor daño que los bioensayos durante 10 días y tiempos más prolongados de recuperación evidencian mayor grado de reversión de daños. Ambas técnicas, tanto EC como MN y AMN constituyen herramientas sensibles y complementarias a los análisis fisicoquímicos en la evaluación integral de ambientes acuáticos.

ABSTRACT

In recent years, aquatic environments have received special attention due to the increased levels of pollutants from industrial, urban and agricultural disposal wastes. This situation is observed in the Paraná River, which concentrates large urban areas through its course. When enters to Argentinian territory in the Misiones province, it receives effluents from three paper and pulp mill industries as well as the contribution of urban wastes for which very few localities have effluent treatment plants. In the present study was proposed to evaluate the genotoxic potential of Paraná River waters from the stretch that runs through the province of Misiones during the period 2009 to 2011. For this purpose were applied the comet (CA), micronucleus (MN) and nuclear abnormalities (NA) assays both *in vivo* bioassays with the species *Corbicula fluminea*, *Limnoperna fortunei* and *Steindachnerina brevipinna* as *in vitro* by exposing CHO-K1 cells to water samples collected at the sites: Iguazú, Puerto Piray, Puerto Mineral and Posadas. Ten specimens of each species were exposed for 3 and 10 days, while CHO-K1 cells were treated for 2 hs (CA) and 15 hs (MN and NA). Positive and negative controls were made, as well as DNA damage recuperation for 5, 10 and 15 days and Water Quality Index (WQI) determination for each site of study. Genotoxic effects were detected in all cases. Piray and Mineral water samples promoted the higher DNA damage level detected with both techniques, but only Piray have shown statistically significant differences in all biological models. Posadas and Iguazú samples induced lower damage level. Complex mixtures of paper mill industries and urban wastes could produce direct damages potentially repairable as well as other observed aneugenic and clastogenesis effects. Acute treatments denote higher damage level than the 10 days bioassays, and more prolonged recuperation times evidence greater reversion degree of damage. Both CA and MN/NA techniques represent sensitive and complementary tools with physicochemical analysis for an integral evaluation of aquatic environments.

A decorative graphic at the top of the page features a central point from which numerous thin, teal-colored lines radiate outwards, creating a sunburst or starburst effect. The lines are more densely packed on the right side and become more sparse towards the left. The background behind the lines is a gradient of teal colors, ranging from a very light, almost white shade on the left to a darker teal on the right.

INTRODUCCIÓN

I MARCO GENERAL

En los últimos siglos, la humanidad fue protagonista de importantes modificaciones en su entorno. El incremento progresivo en los niveles de industrialización, producción y actividad agrícola, asociados a una densidad poblacional en constante crecimiento, han aumentado significativamente la cantidad, diversidad, transporte y consumo de productos químicos; como también de la eliminación de los desechos y residuos resultantes de estos procesos (Zagatto, 2006).

Como consecuencia, la forma más intensa de degradación del ambiente es la contaminación, cuyas fuentes principales son de origen antropogénico (Kattan, 2001).

Según Ferrari (2006), entre las actividades responsables de dicha contaminación se incluyen:

- Actividades productivas: explotación de recursos renovables y no renovables; la agricultura y sus productos derivados: plaguicidas, herbicidas y fertilizantes; y la industria con sus respectivas emisiones y desechos.
- Actividades no productivas: transporte, servicios y actividades domésticas con producción y eliminación al ambiente de gases, químicos y aguas servidas.
- Procesos sociales y culturales: urbanización, crecimiento demográfico y economía de consumo.

Los efectos de la contaminación sobre la calidad del agua, del aire y del suelo son motivo de gran preocupación por las amenazas que representan no sólo para la salud humana sino también para la biodiversidad, la variabilidad genética y la extinción de especies en poblaciones naturales (Bickham *et al.*, 2000; Kattan, 2001).

Se puede definir entonces a la contaminación ambiental o polución como la *introducción o presencia de sustancias, organismos o formas de energía en ambientes o sustratos a los que no pertenecen o en cantidades superiores a las propias de dichos sustratos, por un tiempo suficiente, y bajo condiciones tales, que esas sustancias interfieren con la salud y la comodidad de las personas, dañan los recursos naturales o alteran el equilibrio ecológico de la zona* (Albert, 1997).

En términos generales, los contaminantes pueden agruparse en tres tipos (Carballo y López Nigro, 2006; Ferrari, 2006):

- Biológicos: organismos que se encuentran en concentraciones que exceden a las naturales en determinados sustratos, o que no pertenecen a él.

- Físicos: presencia de formas de energía que sobrepasan los niveles basales en el sustrato en que se encuentran.

- Químicos: pueden ser de origen natural o antropogénico. En el primer caso, se debe a la incorporación en el ambiente de sustancias naturales en cantidades tales que superan los mecanismos de degradación. En el segundo caso, se trata del ingreso al ambiente de sustancias denominadas xenobióticas, es decir, químicos foráneos para los que no existirían mecanismos naturales de degradación.

Recién a partir del año 1960 la contaminación cobra relevancia a nivel internacional debido a los problemas causados al hombre y su ambiente. El interés por estas cuestiones se intensificó aún más en las últimas décadas debido a la ocurrencia de accidentes con productos químicos que adquirieron repercusión mundial. Surgen así las primeras acciones por conocer causas y efectos no deseados de distintos agentes tóxicos (Mudry y Carballo, 2006; Zagatto, 2006).

El agua constituye uno de los recursos naturales más importantes y actualmente en mayor riesgo, ya que se convierte en el destinatario final de los numerosos contaminantes antrópicos, muchos de los cuales son sustancias potencialmente tóxicas con capacidad de causar efectos nocivos en los organismos vivos (Jha, 2004; Bertolletti y Zagatto, 2006; Picco *et al.*, 2010).

De acuerdo con su naturaleza, estos agentes son capaces de interactuar con diferentes estructuras biológicas y en consecuencia, causar distintos tipos de alteraciones. Aquellos que tienen la capacidad de dañar el material genético actuando directa o indirectamente sobre su estructura, se conocen genéricamente como agentes genotóxicos y en ciertos casos pueden inducir mutaciones, carcinogénesis o teratogénesis (Picco *et al.*, 2010).

En muchos casos, los efectos de las sustancias tóxicas no pueden detectarse en forma inmediata o a corto plazo por los métodos físico-químicos habituales, sino que son el resultado de la exposición crónica a concentraciones muy bajas. Una vez que dichos efectos se hacen evidentes en los individuos, poblaciones o ecosistemas, pueden tornarse irreversibles (Van der Oost *et al.*, 2003).

Los eventos mencionados han conducido así al surgimiento de disciplinas especializadas en estas temáticas, tales como la Genética Toxicológica y la Ecotoxicología, que se desarrollan en torno a objetivos tanto científicos como tecnológicos y prácticos (Ferrari, 2006).

Desde una perspectiva política y administrativa, en 1992 los miembros de las Naciones Unidas en la Conferencia Mundial sobre Desarrollo y Medio Ambiente,

adoptaron un plan de Desarrollo Sustentable para el siglo XXI. El Desarrollo Sustentable implica aspectos sociales, económicos y ecológicos de todos los dominios públicos tanto a nivel local y regional, como nacional e internacional. Es decir, un desarrollo que logre satisfacer las necesidades del presente sin comprometer a las futuras generaciones (Kienzl *et al.*, 2003).

Estos escenarios plantearon el surgimiento de los denominados estudios de Evaluación de Riesgo Ambiental (ERA), que han adquirido mayor atención a medida que los expertos y el público en general comprendieron que ciertos químicos no tóxicos para la salud humana, pueden tener efectos deletereos sobre los recursos naturales. Estos estudios implican la identificación y caracterización del riesgo, como también la probabilidad de ocurrencia de efectos adversos sobre todos los componentes del ecosistema, que sirvan de base para el establecimiento de medidas regulatorias (Van der Oost *et al.*, 2003).

Uno de los pasos principales en los procesos ERA lo constituye el Monitoreo Ambiental, que consiste en la observación repetitiva de uno o más elementos químicos o biológicos, en base a objetivos definidos dentro de un esquema organizado en tiempo y espacio, utilizando métodos comparables y estandarizados.

Para evaluar el riesgo que suponen los contaminantes ambientales sobre los organismos y clasificar la calidad de los distintos ambientes, el monitoreo puede centrarse en componentes fisicoquímicos (Monitoreo Fisicoquímico) o en componentes biológicos en todos los niveles (Monitoreo Biológico o Biomonitoreo). El enfoque más adecuado en este sentido es el Programa de Monitoreo Integrado, donde confluyen actividades destinadas a evaluar ambos componentes en los distintos compartimentos ambientales (Kienzl *et al.*, 2003; Van der Oost *et al.*, 2003).

II AMBIENTE ACUÁTICO Y CONTAMINACIÓN ANTRÓPICA

El ambiente acuático cubre dos tercios del planeta y está habitado por una gran parte de las especies existentes, muchas de las cuales constituyen fuentes importantes para la alimentación humana (Jha, 2004). Sin embargo, sólo un 0,06% del total del agua del planeta se encuentra como agua superficial. Más de la mitad de este porcentaje es agua salobre o salada, por lo que solamente un 0,02% puede catalogarse como agua dulce. De todas las aguas superficiales, los ríos y arroyos representan sólo el 0,001% en apenas 10.000 km³ (Antón, 2000).

Numerosas ciudades importantes se comunican directa o indirectamente con el ambiente acuático y muchos de los principales ríos del mundo atraviesan grandes áreas metropolitanas. De hecho, se estima que el 70% de la población humana reside dentro de un margen de 60 km próximo a las zonas costeras y este porcentaje se incrementa de manera constante. Durante los dos últimos siglos la población mundial ha aumentado desde menos de 1000 millones de personas en el año 1.800 a más de 6.000 millones a inicios del 2000. Con las tasas de crecimiento actuales, se espera que la población duplique su número en menos de 40 años. Este avance acelerado de la revolución urbana mundial paralelo al desarrollo industrial, la producción y el consumo, han llevado al progresivo deterioro del ambiente acuático. Dado que el agua constituye un solvente útil y versátil, es empleada con frecuencia para el transporte de desechos a partir del sitio de generación y descarga, convirtiéndose así en el sumidero final de los contaminantes antropogénicos. Los cuerpos de agua superficiales son más susceptibles a la contaminación antrópica y paradójicamente constituyen la principal fuente de agua potable, al mismo tiempo que son parte esencial de las actividades agrícolas y de recreación para las poblaciones humanas en todo el mundo (Ohe *et al.*, 2004; Jha, 2004).

De acuerdo con Antón (2000), las principales fuentes antrópicas de contaminación del ambiente acuático son:

1. Efluentes cloacales domésticos y municipales.
2. Efluentes industriales.
3. Efluentes y drenajes de campos agrícolas.
4. Efluentes y drenajes de canteras y minas.
5. Lavados de fertilizantes y pesticidas.
6. Lluvia ácida.

Debe citarse también la construcción de centrales hidroeléctricas y embalses, que si bien producen modificaciones relativamente menores a nivel de calidad del agua, pueden tener un impacto importante en los ecosistemas acuáticos alterando los pulsos de crecientes e inundaciones, incrementando la sedimentación y obstaculizando la dispersión y migración de especies (Primack *et al.*, 2006; Baigún *et al.*, 2011).

Entre los contaminantes más importantes encontrados en el agua como consecuencia de las actividades mencionadas anteriormente, se encuentran (Antón, 2000; Markert *et al.*, 2003):

- Compuestos orgánicos degradables: heces, solventes, pesticidas, sustancias tensoactivas, grasas, aceites, residuos solubles de origen vegetal y animal, químicos básicos, agentes patógenos, productos finales e intermediarios de procesos industriales.
- Compuestos orgánicos persistentes: solventes, sustancias tensoactivas, pesticidas (hidrocarburos clorados, organofosforados, carbamatos), productos finales e intermediarios de procesos industriales y ciertos derivados del petróleo.
- Compuestos inorgánicos: metales pesados, sales, fertilizantes, cianuros, cromatos y sustancias radiactivas.

En las últimas décadas se ha incrementado notablemente el número de sustancias liberadas al ambiente. Actualmente, se conocen más de 10 millones de sustancias químicas diferentes y unas 100.000 se encuentran en uso. Entre ellas, alrededor de 600 corresponden a pesticidas empleados en todo el mundo y a esto debe agregarse la incorporación al mercado de 1.000 a 2.000 sustancias nuevas cada año (Kienzl *et al.*, 2003; Mozeto y Zagatto, 2006; Baršienė *et al.*, 2013).

El Inventario de Emisiones Tóxicas de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) reportó durante el año 2001 más de 100.000 toneladas métricas de químicos liberados en aguas superficiales (Claxton *et al.*, 1998; Ohe *et al.*, 2004). No obstante, los volúmenes de emisión difieren entre las distintas actividades. Mientras que las actividades industriales raramente liberan más de 10^7 litros por día, las plantas de tratamiento de aguas residuales y desechos urbanos de las grandes ciudades, exceden frecuentemente los 10^8 litros diarios (White y Rasmussen, 1998).

Los procesos industriales y desechos urbanos liberan, entre otros compuestos, grandes cantidades de nitratos y fosfatos a los cuerpos de agua, dando lugar en muchos casos a procesos de eutrofización que alteran las comunidades biológicas. Otros compuestos reducen el oxígeno disuelto del agua (efluentes de industrias de alimentos, procesamiento de carnes, mataderos, curtiembres, industrias de pulpa y papel). Por otra parte, los vertidos crudos de determinados efluentes contienen hidrocarburos de elevado peso molecular y altamente persistentes en los ecosistemas acuáticos. Al encontrarse en estado líquido, afectan a las aguas superficiales. Los hidrocarburos halogenados empleados como insecticidas, los bifenilos policlorados (PCBs) y otros compuestos relacionados, son escasamente degradables y uno de los principales contaminantes de las comunidades bióticas a partir de los vertidos al agua. Al ser persistentes, estas sustancias pueden acumularse en los organismos vivos a través de las cadenas tróficas, interferir con los

procesos hormonales u otros procesos biológicos mediados por enzimas y modificar el material genético. (Magariños, 2006; Primack *et al.*, 2006; Baršienė *et al.*, 2013).

III RÍO PARANÁ

Los ríos revisten gran importancia, ya que involucran complejas interacciones de la biota con su ambiente físico y químico. Constituyen ecosistemas abiertos con fenómenos de importación y exportación constantes de energía, nutrientes y agua, característica que los hace particularmente dinámicos. Por lo tanto, todo lo que ingrese en su tramo superior o cabecera, afectará de una u otra manera su tramo inferior o potamal.

América Latina es considerada el subcontinente más fluvial del planeta, donde se encuentran algunos de los mayores ríos del mundo conformando cuencas hidrográficas complejas (Antón, 2000; Lorenz, 2003; Pinheiro Silveira, 2004).

El Paraná es el río principal de la Cuenca del Plata y la segunda cuenca hidrográfica más extensa de América del Sur, con un recorrido de 2.600.000 km² (Bilos *et al.*, 1998; Agostinho y Ferreira, 1999).

Nace en el estado brasileño de Minas Gerais a partir de la confluencia de los ríos Grande y Paranaíba. Desde aquí hasta su desembocadura en el Río de la Plata, recorre aproximadamente 3.800 km, de los cuales 1.927 km escurren por territorio argentino. Se pueden distinguir a lo largo de su recorrido cuatro regiones bien diferenciadas: el tramo Superior, desde su nacimiento hasta los antiguos Saltos del Guayrá situados en territorio brasileño a pocos kilómetros de la frontera con Argentina y hoy sepultados por el lago de la represa Itaipú. El tramo denominado Alto Paraná se inicia inmediatamente aguas abajo de este sitio, donde se conformaba un cañón que daba origen al subtramo N-S y en cuyo extremo el río cambia de rumbo en sentido E-O, hasta alcanzar al Río Paraguay y conformar el tramo conocido como Paraná Medio (Bonetto y Hurtado, 1998). Hasta este punto, además de los ríos que le dan origen, el Paraná cuenta con al menos 11 cuencas tributarias, la mayor parte de ellas localizadas en Brasil. A partir de su confluencia con el Río Paraguay, el Paraná se extiende en dirección general N-S y aguas abajo de las ciudades de Diamante (Entre Ríos) y Rosario (Santa Fé), se inicia el tramo denominado Paraná Inferior. Este último se dirige en sentido S-E confundiendo con el Delta Paranaense y terminando frontalmente con el Río de la Plata.

En el área comprendida por la Cuenca del Plata reside el 75% de la población argentina, ubicándose las ciudades más importantes y las principales actividades

productivas. Por su parte, la zona correspondiente a la cuenca del Alto Paraná, drena un área con grandes centros urbanos, industriales y agrícolas, constituyendo la región más densamente poblada de Brasil. A esto debe agregarse que más del 70% de la producción hidroeléctrica del vecino país se genera en esta región (Agostinho y Ferreira, 1999; Agostinho *et al.*, 2007).

En la cuenca del Paraná, pocos tramos del río mantienen sus características líticas originales, ya que gran parte de la misma se vió afectada por los numerosos represamientos sobre su curso, inclusive en sus principales afluentes. Más de 3.000 km del río fueron transformados en embalses o cadenas de embalses, existiendo actualmente un total de 450 represas que cubren el 38% de la superficie total embalsada. Esto convierte al Río Paraná en una de las cuencas más reguladas del mundo (Agostinho *et al.*, 2007; Baigún *et al.*, 2011).

Entre sus afluentes importantes, el Río Tieté, que atraviesa la ciudad de San Pablo, está actualmente muy contaminado. A su vez el Río Paranapanema es uno de los más utilizados para producción hidroeléctrica en el sur de Brasil. A continuación, la represa de Itaipú, una de las mayores del mundo, conforma un gran lago irregular que remata toda la serie de represas brasileras y brasiler-paraguayas. Finalmente, el último afluente del Paraná antes de su ingreso a territorio argentino lo conforma el Río Iguazú, en el que también han sido construídas numerosas represas localizadas aguas arriba de las cataratas homónimas. Una vez que el Río Paraná ingresa a territorio argentino a través de la provincia de Misiones, incrementa levemente su velocidad de escurrimiento hasta encontrarse con la represa de Yacyretá en la provincia de Corrientes, donde las planicies de inundación están sometidas a la influencia de dicha represa (Bonetto y Hurtado, 1998).

La provincia de Misiones se encuentra rodeada por algunos de los ríos más importantes de la Cuenca del Plata, teniendo como límites naturales: el Río Iguazú al Norte, el Río Paraná al Oeste y el Río Uruguay al Este. Cuenta además con una importante red hidrográfica interna, donde la mayoría de los cursos drenan hacia el Río Paraná, pudiendose identificar al menos veintiséis subcuencas tributarias (López *et al.*, 2005).

La actividad industrial de Misiones es modesta en comparación con otras provincias, teniendo como principal exponente a la forestoindustria y en menor medida, a industrias yerbateras, cítrícolas y frigoríficas. Sin embargo, el sector que despierta mayor interés lo integran las industrias de celulosa y papel, siendo Misiones la única provincia donde se emplazan tres establecimientos de esta índole situados dentro de un trayecto de tan sólo 200 km sobre el margen del Río Paraná. Todas estas industrias se relacionan directa o

indirectamente con el río a través de la descarga de sus efluentes, algunos de los cuales reciben tratamiento previo, en tanto otros son volcados en crudo. A esto debe agregarse el hecho de que la mayor parte de las localidades de la provincia no cuenta con infraestructuras destinadas al tratamiento de residuos domiciliarios, los que desagotan en pequeños afluentes o en forma directa al Paraná. Por lo tanto, el aporte de contaminación química y bacteriana en los últimos años, ha condicionado la calidad del agua en la provincia.

Otro factor agravante lo constituye el uso de biocidas, tal como ocurre en otras zonas agrícolas de la cuenca del Paraná en Argentina, y donde los agroquímicos organoclorados persistentes junto a ciertos metales pesados, resultan muy tóxicos para la biota que habita el ecosistema acuático (Simoniello *et al.*, 2009).

En nuestro país, son escasos los estudios referidos al impacto de los contaminantes en la cuenca del Río Paraná y en su mayoría responden a evaluaciones realizadas en la zona del Delta (Bilos *et al.*, 1998; Cataldo *et al.*, 2001). En la región comprendida por el Alto Paraná, los únicos datos disponibles se deben, en parte, a mediciones realizadas en estaciones de muestreo para zonas de influencia de la represa Yacyretá sobre el cauce principal del Río Paraná y algunos de sus afluentes más importantes en la provincia de Misiones. De acuerdo a estos análisis realizados entre los años 1993 y 2011, el agua para esta zona es considerada de calidad regular (por debajo del nivel aceptable) si se considera su utilización para consumo humano con tratamiento convencional y de mala calidad en cuanto a protección para la vida acuática. En numerosas muestras, metales como el Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Hg, Ni y Zn, superaron los límites de detección permitidos por la normativa vigente en la provincia de Misiones, según los niveles guía de calidad de agua propuestos por la Secretaría de Recursos Hídricos Cuenca del Plata (EBY-CECYT-CONICET, 2012). Por otra parte, el registro de metales en el Río Paraná a la altura de las localidades de Iguazú, Puerto Esperanza y Puerto Rico (norte y centro de la provincia de Misiones) y del Río Iguazú, sobrepasó los niveles de protección para la vida acuática para el Cd, Cu, Fe, Pb y Zn (N. Schenone, Comunicación personal, enero 18, 2013).

Si bien el caudal elevado del Río Paraná (con un promedio de 15.000 m³/seg.), sugiere una gran capacidad de dilución y purificación, la escasez de información para esta zona sumada al hecho de que se han detectado daños en el ADN de modelos biológicos expuestos a estas aguas (Caffetti *et al.*, 2008), demuestran claramente que los estudios de contaminación y su impacto sobre las comunidades biológicas asociadas, son insuficientes.

IV GENÉTICA TOXICOLÓGICA AMBIENTAL

La Toxicología clásica ha sido definida como el estudio de los efectos adversos de xenobióticos, o bien, como una parte de la ciencia que se ocupa del estudio de los venenos. El médico alemán Joseph Bonaventura Orfila (1787-1835) es considerado el fundador de la toxicología moderna, con sus estudios sistemáticos sobre las intoxicaciones causadas por los venenos conocidos hasta ese momento. La toxicología, cuyos orígenes se dieron en un contexto farmacológico con énfasis en los efectos sobre el hombre, ha experimentado desde entonces una amplia expansión en cuanto a su enfoque y alcanzó su máximo desarrollo en el siglo XX. Aunque los casos más destacados de contaminación se iniciaron a fines del siglo XIX durante la Revolución Industrial, los mismos se agravaron después de la Segunda Guerra Mundial con el aumento en el consumo de energía, la extracción y la producción de sustancias para las cuales los mecanismos naturales de asimilación o degradación se vieron rebasados o no existen. Estos eventos dieron origen al desarrollo de la Toxicología Ambiental (Albert, 1997; Piñeyro-López, 1997; Carballo, 2006).

Como consecuencia, se despertó el interés acerca de los posibles efectos ecológicos de los contaminantes y se originó durante los años 1950 y 1960, otra disciplina especializada dentro de las ciencias ambientales, denominada Ecotoxicología.

El término Ecotoxicología fue sugerido por primera vez por el toxicólogo René Truhaut en 1969 y en el año 1976 esta nueva ciencia fue definida por el Comité Científico Internacional sobre Problemas Ambientales (SCOPE) como: *“ciencia que estudia los efectos de sustancias naturales o sintéticas sobre los organismos vivos, poblaciones y comunidades, animales o vegetales, terrestres o acuáticas, que constituyen la biosfera, incluyendo así la interacción de las sustancias con el medio en que viven los organismos, en un contexto integrado”*.

La Ecotoxicología se origina a partir de la interacción de dos disciplinas principales: la Ecología y la Toxicología. Sin embargo, en cuanto a la práctica, es considerada una ciencia sintética que emerge de la interacción multidisciplinaria entre Toxicología, Ecología, Biología, Bioquímica, Epidemiología y Química, entre otras. Puede decirse entonces que tiene como tarea general evaluar, monitorear y predecir el destino de sustancias extrañas en el ambiente y su efecto sobre los individuos, con implicancias en las poblaciones y los ecosistemas.

La Ecotoxicología es considerada una ciencia joven y recién a partir de la década de 1970 comienzan a establecerse los criterios, principios y aplicaciones de la Ecotoxicología

Acuática para el control de la contaminación hídrica. Al mismo tiempo, la observación de que los límites establecidos para varias sustancias tóxicas en forma aislada, no podrían preservar la calidad del agua necesaria para proteger la vida acuática, se inicia un acelerado desarrollo de esta disciplina. Desde entonces, se ha focalizado en el conocimiento de la toxicidad de efluentes líquidos complejos y de las interacciones entre los agentes tóxicos presentes en dichos efluentes, como también de sus efectos sobre la biota acuática (Ferrari, 2006; Magariños, 2006; Zagatto, 2006).

Los avances logrados en estos campos permitieron identificar numerosas sustancias con efectos sobre el material genético (ADN) de los individuos expuestos. Por este motivo, en la década de 1980 las agencias ambientales y órganos de salud pública en varios países industrializados, incorporaron la genotoxicidad y mutagenicidad a las propiedades tóxicas a ser evaluadas tanto en el análisis de compuestos o mezclas de sustancias presentes en el ambiente, como a los agentes químicos, aditivos alimentarios y medicamentos antes de su introducción al mercado.

De esta manera, se dio gran impulso a una nueva especialidad: la Genética Toxicológica, que fue reconocida como disciplina alrededor de 1969 con la fundación de la Sociedad de Mutagénesis Ambiental (Ribeiro y Marques, 2003).

Esta disciplina integra los conceptos de la Genética (estudio de los mecanismos de la herencia y sus leyes) y de la Toxicología, para ocuparse de los efectos genotóxicos y/o mutagénicos de los agentes físicos, químicos o biológicos, y de las consecuencias sobre los seres vivos, el ambiente y la salud humana como producto de la exposición a dichos agentes.

Según Carballo (2006) los objetivos que plantea la genética toxicológica se basan en investigaciones sobre:

- Mecanismos de genotoxicidad y/o mutagenicidad, es decir, el modo en que los agentes provocan daño en el material genético de los sistemas experimentales.
- Clasificación del tipo y frecuencia de las alteraciones en el ADN.
- Aplicación en sistemas de prueba o ensayos para la detección y caracterización de mutágenos.
- Establecimiento de criterios para el asesoramiento sobre riesgo de exposición a mutágenos o carcinógenos.

Este marco de trabajo diferencia la Genética Toxicológica de la Genética Ecotoxicológica. Mientras que la primera estudia la interacción entre las sustancias que

dañan el ADN y sus consecuencias, en función de los efectos sobre la salud de los organismos, la segunda se enfoca en la aplicación de los principios y las técnicas que provee la Genética Toxicológica para evaluar los potenciales efectos de la contaminación ambiental sobre la salud del ecosistema.

En este contexto y a la luz de los avances de la Genética Molecular, en el año 1993 el Instituto Nacional de Ciencias Ambientales (USA) plantea las acciones futuras en los campos de la Ecotoxicología Genética y Molecular, a raíz del escaso conocimiento de los posibles efectos deletéreos de los contaminantes ambientales a nivel poblacional y de ecosistemas (Shugart y Theodorakis, 1998).

V GENOTOXICIDAD, MUTAGÉNESIS Y CARCINOGENÉISIS

La Genética Toxicológica, a diferencia de otras disciplinas en Toxicología, se ocupa de aquellos compuestos que en un sentido convencional no se consideran tóxicos, ya que no provocan efectos adversos inmediatos o fácilmente identificables, sino que pueden ser condicionantes para el desarrollo de alteraciones de la salud, como el cáncer. Tal es el caso de los compuestos cuyos efectos pueden pasar inadvertidos inicialmente, pero dejan su impronta en el ADN y su potencialidad genotóxica se manifiesta a mediano o largo plazo (Ribeiro y Marques, 2003; Picco *et al.*, 2010).

En este contexto, se limitó el término genotóxico a aquellos agentes que causan daño en el material genético a dosis subtóxicas. La importancia de estos estudios se basa en la relación existente entre genotoxicidad y efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos con el potencial de afectar directa o indirectamente la salud humana.

Las mutaciones resultan de la interacción física o química de ciertos agentes (mutágenos) con la secuencia de bases del ADN, alterando su estructura. Las mutaciones pueden afectar tanto a células somáticas como germinales, con diferentes consecuencias individuales y poblacionales. Las mutaciones que ocurren en células somáticas afectan solamente al organismo portador y pueden conducir a la muerte de la célula involucrada, o bien dar origen a enfermedades agudas, crónicas, o a cambios irreversibles desencadenantes de procesos neoplásicos. Estos procesos son conocidos como carcinogénesis e involucran múltiples alteraciones genéticas que conducen a una proliferación celular descontrolada. Por otra parte, varias sustancias genotóxicas en virtud de su alta reactividad, pueden dañar y alterar el material genético de las células germinales, ocasionando defectos heredables cuyo campo de estudio se denomina mutagénesis.

Cuando los efectos se manifiestan durante el desarrollo embrionario, los mismos se agrupan bajo el concepto de teratogénesis (Mitchelmore y Chipman, 1998; Mudry y Carballo, 2006; Picco *et al.*, 2010).

La exposición a sustancias genotóxicas puede modificar el ADN de diversas maneras, ya sea a través de la formación de aductos (uniones covalentes de químicos específicos con el ADN), causando entrecruzamientos de pares de bases o de proteínas con el ADN, o provocando daño estructural generalizado (roturas de las cadenas del ADN tanto de una sola hebra como de ambas). Estas roturas pueden ocurrir también como consecuencia de la generación de sitios lábiles a los álcalis en la molécula de ADN, uno de los efectos secundarios de muchos contaminantes que producen daño oxidativo a través del ciclo redox de los metabolitos (Mitchelmore y Chipman, 1998; Shugart y Theodorakis, 1998; Shugart *et al.*, 2003).

De acuerdo a Picco *et al.* (2010), estas alteraciones genotóxicas pueden conducir a distintos tipos de mutaciones:

- Mutaciones puntuales: microlesiones en la molécula de ADN que generan pequeños cambios en la secuencia de bases. Pueden producirse por sustituciones (transiciones o transversiones) y pérdidas o adiciones (corrimiento del marco de lectura) de las bases nitrogenadas.

- Mutaciones cromosómicas: alteraciones en la morfología cromosómica, también denominadas macrolesiones o aberraciones cromosómicas. Se agrupan bajo el concepto de clastogénesis y pueden clasificarse estructuralmente como: tipo subcromátide (brechas intersticiales o “gaps” y adhesividad cromosómica), que se originan a partir de la rotura de una sola cadena del ADN; tipo cromátide (fracturas cromosómicas e intercambio de cromátides), que se originan a partir de la rotura de ambas cadenas del ADN luego del periodo de síntesis (S) del ciclo celular; y tipo cromosoma (fragmentos cromosómicos, cromosomas en anillo, inversiones e intercambios), que se originan a partir de la rotura de ambas cadenas del ADN antes del periodo S.

- Mutaciones genómicas: cambios en el número cromosómico. Pueden ser aneuploidías (pérdida o ganancia de uno o más cromosomas del complemento, por ejemplo: nulisomías, trisomías etc.) o euploidías (pérdida o ganancia de complementos cromosómicos completos, como ser: monoploidías, triploidías, etc.)

La potencialidad genotóxica de numerosos efluentes industriales y urbanos, incluso con capacidades mutagénicas y carcinogénicas, ha sido demostrada. Estos efectos fueron evaluados tanto en los mismos efluentes como en aguas superficiales (principalmente ríos),

que actúan como receptores directos o indirectos de este tipo de residuos contaminantes (Vargas *et al.*, 1988; Houk, 1992; White y Rasmussen, 1998; Matsumoto *et al.*, 2003; Reifferscheid *et al.*, 2008; Rigonato *et al.*, 2010; Kushwaha *et al.*, 2012). De acuerdo a la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), el 0,8 % de los químicos liberados en aguas superficiales representan carcinógenos potenciales o demostrados en los seres humanos, en su mayoría con propiedades clastogénicas (Ohe *et al.*, 2004). En base al potencial mutagénico hallado en bacterias (test de Ames), los efluentes industriales fueron categorizados en un rango de elevada a baja genotoxicidad. Entre estos efluentes, aquellos pertenecientes a la fabricación de pulpa y papel, manufactura química de compuestos orgánicos y resinas, industrias textiles y refinerías de petróleo, se encontraron dentro de las categorías de mayor genotoxicidad (Houk, 1992; Claxton *et al.*, 1998). En algunos casos, los efectos pueden atribuirse a contaminantes industriales y/o urbanos específicos, tales como hidrocarburos aromáticos polinucleares (PHAs), bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas y metales pesados. Sin embargo, al considerar los efluentes en su totalidad, el potencial mutagénico de los mismos puede incrementarse hasta en diez órdenes de magnitud. En otros casos, los compuestos responsables de dichos efectos no pueden ser identificados o aún no se conocen (Houk, 1992; Vargas *et al.*, 1995; Rajaguru *et al.*, 2002; Kushwaha *et al.*, 2012).

Como consecuencia de la exposición a este tipo de contaminantes, no sólo se ha demostrado la relación existente entre ciertas mutaciones con eventos carcinogénicos, sino también un incremento de la carga mutacional en las poblaciones. Se entiende como carga mutacional al conjunto de mutaciones no específicas cuyos efectos si bien no son deletéreos, pueden acumularse en el genoma y persistir dentro de las poblaciones resultando eventualmente en una disminución de la variabilidad genética, el fitness y el tamaño de las mismas (López-Barea y Pueyo, 1998; Bickham *et al.*, 2000; Belfiore y Anderson, 2001; Gielazyn *et al.*, 2003).

VI TOXICOCINÉTICA Y TOXICODINAMIA

Los efectos tóxicos de los contaminantes ambientales, principalmente aquellos con potencialidad genotóxica, dependen de una serie de procesos ecotóxicos que implican primeramente la concentración y el transporte de las sustancias en el ambiente y luego las biotransformaciones durante su paso por la cadena trófica. Estos procesos, que determinan la incidencia de la exposición y la respuesta de los organismos, constituyen las fases

toxicocinéticas y toxicodinámicas de los contaminantes ambientales (Peña *et al.*, 2001; Magariños, 2006).

En los sistemas acuáticos naturales, los organismos pueden estar expuestos no sólo a un tipo de contaminante, sino a una mezcla de diferentes sustancias en forma simultánea. De hecho, la mayor parte de los mutágenos y carcinógenos son descargados como componentes de mezclas complejas en efluentes líquidos y desechos sólidos (Claxton *et al.*, 1998; Jha, 2004; Bolognesi y Hayashi, 2011).

En estos casos, los efectos de una sustancia determinada pueden variar como consecuencia de las siguientes interacciones: efectos aditivos, sinérgicos, de potenciación, antagónicos o de tolerancia (Ruiz y Fortoul van der Goes, 1997; Mozeto y Zagatto, 2006).

Los niveles de distintos contaminantes en la biota están determinados a su vez por la cinética de ingreso, captación y eliminación. El destino metabólico de las sustancias puede afectar su toxicidad y determinar su distribución y excreción por parte de los organismos. Los procesos involucrados durante estas etapas son la biotransformación, bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación (López Barea y Pueyo, 1998; Oost *et al.*, 2003; Ferrari, 2006; Mozeto y Zagatto, 2006):

Finalmente, el riesgo genotóxico de un contaminante depende de la eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN en los organismos involucrados. Estos mecanismos son los responsables de la reversión del daño genotóxico ocasionado y del modo en que estos agentes pueden tornarse mutagénicos. Esto se debe a que usualmente las aberraciones cromosómicas, la activación de oncogenes y la disfunción proteica no son consecuencia de la interacción directa de los genotóxicos con el ADN, sino de fallas en los mecanismos implicados en su reparación. Los dos tipos principales de mecanismos involucrados son los mecanismos de reparación y los mecanismos de tolerancia.

Entre los primeros, se pueden identificar los sistemas directos de reparación que revierten el daño actuando sobre los nucleótidos afectados mediante la función de una única enzima (fotorreactivación, alquiltransferencia y reparación directa oxidativa) y los sistemas de reparación por escisión (de bases, de nucleótidos, de apareamientos erróneos, de rupturas de doble cadena o recombinacionales y de reparación genómica global).

En cuanto a los mecanismos de tolerancia, también conocidos como sistemas de reparación SOS, son los responsables de permitir que las interrupciones producidas en puntos dañados de la cadena de ADN durante la replicación, sean pasadas por alto de manera que la replicación pueda continuar (Shugart y Theodorakis, 1998; Agnez-Lima *et al.*, 2003; Prieto González y Papeschi, 2006).

VII MONITOREO BIOLÓGICO, BIOINDICADORES, BIOENSAYOS Y BIOMARCADORES

La naturaleza química compleja de los contaminantes liberados al ambiente acuático, ha hecho que las técnicas analíticas convencionales no sean suficientes en la detección y evaluación de su impacto, particularmente ante bajas concentraciones de mezclas variadas. Por ello, el riesgo asociado a dichas mezclas no puede anticiparse de manera adecuada basándose en los efectos y comportamientos de los componentes individuales. Las evaluaciones de calidad ambiental a través de sistemas de monitoreo requieren además un estudio adecuado de los impactos sobre la biota acuática.

Debido a que los sistemas biológicos a menudo constituyen el blanco para la acción tóxica de los contaminantes ambientales, el estudio de los diversos mecanismos que poseen los organismos para combatir y metabolizar xenobióticos puede ofrecer información acerca de la presencia y los efectos de dichos agentes tóxicos. En consecuencia, el monitoreo biológico ha adquirido gran relevancia a través del estudio de diversos biomarcadores cuyas variaciones son inducidas por contaminantes ambientales en diferentes indicadores biológicos (Claxton *et al.*, 1998; López-Barea y Pueyo, 1998; Jha, 2004).

Los principales criterios que deben reunir los bioindicadores son (López-Barea y Pueyo, 1998; Dokulil, 2003; Lorenz, 2003):

- presentar amplia distribución geográfica dentro del area de estudio, o ser tolerantes a la exposición en jaulas y/o acuarios.
- ser fácilmente colectados y manipulados.
- mostrar un estilo de vida sésil o un territorio restringido.
- poseer características biológicas conocidas.

Los biomarcadores se definen como cambios en las respuestas biológicas (variables) inducidas por la presencia de uno o más contaminantes ambientales. Su detección o magnitud puede reflejarse en variaciones tanto de componentes celulares y bioquímicos, como en procesos, estructuras o funciones determinables en un organismo (bioindicador) o una muestra del mismo. Constituyen señales de alerta temprana que reflejan respuestas biológicas adversas ante la acción de un contaminante y se caracterizan por su sensibilidad, relevancia biológica y factibilidad. Se reconocen tres grupos de biomarcadores: de exposición, de efecto y de susceptibilidad (López-Barea y Pueyo, 1998; Peña *et al.*, 2001; Hansen, 2003; Rodriguez, 2006):

De acuerdo con el nivel de estudio que se adopte, Hansen (2003) y Rodríguez (2006) proponen que los biomarcadores pueden clasificarse a su vez en:

Biomarcadores bioquímico-moleculares, biomarcadores genéticos, biomarcadores inmunológicos, biomarcadores histopatológicos y biomarcadores morfológicos.

Los biomarcadores bioquímico-moleculares y genéticos tienen la ventaja de poder correlacionarse con daños a la salud de tipo predictivos y por lo tanto son considerados biomarcadores de efecto temprano. Junto con ellos, otros indicadores tempranos de daño celular como el índice mitótico y la cinética de proliferación celular, otorgan información importante acerca de la citotoxicidad y citostaticidad respectivamente (Carballo y Mudry, 2006).

VIII ENSAYOS *IN VIVO* E *IN VITRO* EN ESTUDIOS DE GENÉTICA TOXICOLÓGICA Y MONITOREO AMBIENTAL

Numerosos modelos experimentales han sido empleados en estudios de Genética Toxicológica para evaluar la capacidad genotóxica de diferentes agentes físicos, químicos y biológicos, como también de efluentes y mezclas contaminantes presentes en los cuerpos de agua. Estos modelos abarcan desde bacterias, pasando por plantas, insectos y moluscos, hasta peces, anfibios, aves y mamíferos, incluyendo células de origen humano (Vargas *et al.*, 1988; Hayashi *et al.*, 1998; Shugart y Theodorakis, 1998; Belfiore y Anderson, 2001; Becker, 2003; Ratte *et al.*, 2003; Jha, 2004; Ohe *et al.*, 2004; Monroy *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2006; Downs *et al.*, 2010; Klobučar *et al.*, 2010; Radić *et al.*, 2010; Galloway *et al.*, 2011).

Los ensayos se realizan en condiciones tanto *in vivo* como *in vitro*. En tanto los ensayos con bacterias o con células *in vitro* pueden emplearse como herramientas de “screening” para definir la genotoxicidad intrínseca de una sustancia, una evaluación del riesgo con relevancia ecotoxicológica, debe considerar la actividad genotóxica expresada en organismos representativos (Jha, 2004). Más de 200 tests de corta duración han sido desarrollados en los últimos cuarenta años para la identificación de agentes que representen riesgos genotóxicos para el hombre (Houk, 1992).

Los ensayos con organismos acuáticos han sido utilizados mundialmente en programas de monitoreo de calidad de aguas y efluentes, o en procedimientos de clasificación y evaluación de riesgo de sustancias químicas en el ambiente. Permiten

evaluar tanto la toxicidad aguda y crónica de sustancias químicas, efluentes líquidos industriales y domésticos, como de aguas marinas y superficiales.

Con respecto a los ensayos establecidos para evaluación de riesgo de sustancias químicas, se ha determinado tradicionalmente el uso de especies de agua dulce representativas de diferentes niveles tróficos (Ratte *et al.*, 2003; Zagatto, 2006).

En cuanto a la evaluación de toxicidad de efluentes y aguas superficiales, es importante conducir ensayos agudos con varias especies diferentes (al menos tres) pertenecientes a grupos taxonómicos distintos. Con ello, se obtiene información acerca de la variabilidad natural en la sensibilidad de distintos organismos. Este abordaje exploratorio resulta útil en la detección de problemas de calidad de los cuerpos hídricos (Domingues y Bertolotti, 2006).

IX PECES Y MOLUSCOS COMO MODELOS BIOINDICADORES

Entre los organismos que se destacan como excelentes modelos centinelas, se encuentran los peces y los moluscos. Ambos constituyen bioindicadores precisos del estado de los ecosistemas acuáticos, al ser particularmente sensibles a la influencia de agentes fisicoquímicos y mezclas de sustancias contaminantes a los que se encuentran expuestos (Chovanec *et al.*, 2003; Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003; Bolognesi y Hayashi, 2011).

La elección de los peces como modelos bioindicadores se debe a que constituyen un grupo muy heterogéneo de vertebrados acuáticos y ofrecen por lo tanto, ejemplos diversos de adaptación y respuesta ante las condiciones ambientales. Se encuentran ampliamente distribuidos y desempeñan un rol importante dentro de las comunidades acuáticas, tanto por su posición clave en los últimos eslabones de la cadena alimentaria como por su requerimiento de grandes volúmenes de agua para la respiración. Esto hace que la exposición a sustancias contaminantes sea más intensa, con el potencial de bioacumular sustancias tóxicas por exposición directa (a través del agua) o indirecta (a través de la cadena alimentaria) y de responder a mutágenos y contaminantes ambientales presentes incluso a muy bajas concentraciones (Al Sabti y Metcalfe, 1995; Ulupinar y Okumus, 2002; Cossins y Crawford, 2005; Klobučar *et al.*, 2010; Šrut *et al.*, 2010). Otra de las propiedades de los peces teleósteos, es que varias especies de pequeño tamaño pueden mantenerse con facilidad en condiciones de laboratorio para estudios de exposición a químicos y muestras de interés. Debido a que los peces frecuentemente responden ante los

tóxicos de manera similar a los vertebrados superiores, pueden emplearse en la detección de sustancias con potenciales efectos carcinogénicos y teratogénicos para el hombre, con la particularidad de que poseen un genoma más plástico y sujeto a cambios genéticos más frecuentes (Al Sabti y Metcalfe, 1995; Çavaş y Ergene-Gözükara, 2003; Cossins y Crawford, 2005; Bolognesi y Hayashi, 2011).

Wirgin y Waldman (1998) proponen tres mecanismos principales que se encuentran conservados en peces y mamíferos:

- 1) la regulación intracelular de la concentración de xenobióticos.
- 2) la transformación metabólica y detoxificación de los xenobióticos.
- 3) la generación de lesiones en el ADN.

Los moluscos, por otra parte, representan uno de los grupos más numerosos dentro del reino animal y dentro de ellos los gastrópodos constituyen cerca del 80% y los bivalvos alrededor del 15%. Estos invertebrados también juegan un rol muy importante en el funcionamiento del ecosistema, ya que ocupan una posición intermedia en la cadena alimentaria.

Las principales características que convierten a los moluscos en bioindicadores ideales son (Gielazyn *et al.*, 2003; Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003; Van Hassel y Farris, 2007; Bolognesi y Hayashi, 2011):

- Amplia distribución geográfica, dentro y entre continentes, facilitando el establecimiento de estudios comparativos a gran escala.
- Estilo de vida sésil o de movilidad limitada.
- Fácil captura y manejo, de manera que pueden emplearse tanto en campo como en laboratorio para estudios pasivos y activos de biomonitoreo. Además, son resistentes al estrés.

Se encuentran en contacto directo con el agua y tienen gran capacidad de bioacumulación de sustancias contaminantes debido a que son organismos filtradores. A diferencia de los vertebrados, cuentan con una capacidad limitada para excretar compuestos directamente a través de los riñones u otros órganos excretores y de metabolizar ciertos químicos orgánicos. Como consecuencia, los contaminantes ambientales pueden exhibir impactos negativos en los moluscos a concentraciones mucho menores que en otros invertebrados y vertebrados (Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003).

En la década de 1920 se inician los primeros bioensayos de toxicidad con organismos acuáticos, utilizando a los peces como indicadores.

Luego, en el año 1976, se inicia en Estados Unidos (EUA) uno de los primeros programas de evaluación ambiental denominado “Mussel Watch”. El mismo se basa en el uso de moluscos acuáticos como organismos indicadores en áreas geográficas extensas. Desde entonces, los bivalvos han sido ampliamente estudiados en este sentido, destacándose principalmente las almejas y los mejillones (Dixon *et al.*, 2002; Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003; Jha, 2004; Pinheiro Silveira, 2004; Bolognesi y Hayashi, 2011).

La evaluación de genotoxicidad en ambos modelos biológicos, ha sido muy importante tanto en estudios de campo como de laboratorio, a los fines de obtener información acerca de la calidad de ecosistemas marinos y de agua dulce. En el año 1998 se publican dos números especiales de la reconocida revista *Mutation Research*, donde se destaca el uso de invertebrados y peces en estudios de Genética Toxicológica (Jha, 2004).

Se han empleado no sólo organismos residentes en el ambiente bajo estudio, sino también organismos transplantados al sitio o muestra de interés. Esto último tiene como ventaja el conocimiento de la localización y duración precisa de la exposición (Hayashi *et al.*, 1998; Mitchelmore y Chipman, 1998; Bolognesi *et al.*, 2004; Baršienė *et al.*, 2008; Klobučar *et al.*, 2010; Šrut *et al.*, 2010; Bolognesi y Hayashi, 2011).

De esta manera, el empleo de peces y moluscos bivalvos como bioindicadores, ha adquirido notable relevancia en cuanto a la determinación y distribución de los efectos tóxicos de contaminantes en el ambiente acuático. Esto permitió su inclusión en programas de monitoreo de calidad ambiental para la evaluación de riesgo (Al Sabti y Metcalfe, 1995; Çavaş y Ergene-Gözükara, 2003; Oost *et al.*, 2003; Aragão y Araújo, 2006; Newton y Cope, 2007; Beyer *et al.*, 2013).

Otra utilidad importante de los ensayos *in vivo* con ambos modelos biológicos, es su capacidad de respuesta al estrés. Considerando el término estrés como la disminución en el fitness o desempeño de un organismo (o población) debido a cambios en las condiciones ambientales, y dependiendo del periodo de exposición ante tal situación, los organismos pueden adaptarse fisiológicamente como consecuencia de una exposición temprana a los contaminantes, modificando así el efecto tóxico de los mismos (Fränzle, 2003; Jha, 2004; Ferrari, 2006).

Esta adaptación permite también su utilización en estudios de recuperación de daños, entendidos como el retorno de los niveles alterados de los biomarcadores que se analizan, a sus niveles basales. De esta manera, se puede evaluar la capacidad potencial de estas especies para reestablecerse en sitios donde haya cesado el aporte de contaminantes. Tales situaciones se han demostrado en la reducción de genotoxicidad de efluentes industriales

derivados del procesamiento de pulpa y papel, luego de la incorporación de tratamientos secundarios de dichos efluentes, como también de sitios altamente contaminados donde las especies de peces y moluscos expuestas a estos ambientes, fueron trasladados a laboratorio bajo condiciones libres de contaminación por un período de tiempo suficiente, donde se verificó la reversión de los daños genéticos causados (Houk, 1992; Claxton *et al.*, 1998, Mitchelmore y Chipman, 1998; Rigonato *et al.*, 2005; Ferrari, 2006).

IX.1 *Steindachnerina brevipinna* (Eigenmann & Eigenmann, 1889)

Los peces de la especie *Steindachnerina brevipinna* pertenecen a la familia Curimatidae y al orden Characiformes, grupo que presenta una amplia distribución a través de la región Neotropical y una elevada diversidad específica en las cuencas fluviales de Argentina.

Esta especie es conocida vulgarmente como “sabalito” y habita las cuencas de los ríos Paraná, Paraguay y Uruguay, mostrando una ocurrencia restringida a Sudamérica (Giora y Fialho, 2003; Brassesco *et al.*, 2004).

Se caracterizan por ser peces de pequeño porte (18 cm de longitud estándar máxima), con cuerpo alargado y rollizo que presenta una conspicua mancha en la aleta dorsal, y una banda lateral a lo largo del cuerpo. La coloración de fondo es plateada y la banda lateral es oscura, pudiendo estar formada por varias manchas que se asemejan al signo igual (=). La cabeza es aguda y relativamente pequeña, con una boca en posición ínfera adaptada a la alimentación a base de algas y detritos orgánicos que obtiene por filtración del fango. Por ello, son frecuentes y muy abundantes en las zonas de aguas quietas y vegetadas. Desde un punto de vista citogenético, muestran un número diploide conservado dentro de la familia, con $2n=54$ cromosomas bibraquiados (Brassesco *et al.*, 2004; Casciotta *et al.*, 2006).

S. brevipinna se destaca por ocupar un papel importante en la cadena trófica debido a su hábito alimentario detritívoro. Esto convierte a la especie en un bioindicador apropiado tanto a nivel del sedimento como del cuerpo de agua, a través de la filtración del alimento. Ha mostrando una elevada sensibilidad a las condiciones de su entorno en relación con otras especies nativas (Giora y Fialho, 2003; Furnus *et al.* en prensa.).

IX.2 *Corbicula fluminea* (Müller, 1774)

Los moluscos bivalvos relacionados a la Cuenca del Plata se encuentran entre los más estudiados de Argentina.

Entre ellos, una de las especies que ha recibido gran atención es *Corbicula fluminea*, conocida vulgarmente como almeja asiática. Estos bivalvos constituyen una de las tres especies exóticas de moluscos de agua dulce que han sido introducidos al continente americano. Pertenecen al Orden Veneroida y a la Familia Corbiculidae (Darrigran, 2004; Rumi *et al.*, 2008).

Son originarios del Sudeste de Asia y su ingreso puede haberse dado a través del sedimento de las aguas de lastre de las embarcaciones ó como alimento de inmigrantes asiáticos a la región. Desde su introducción en la década de 1930 en América del Norte, ha experimentado una rápida expansión hacia todo el continente, encontrándose los primeros registros en América del Sur a través del Río de la Plata, a principios de los años 1970. Actualmente, se distribuye ampliamente por toda la cuenca, abarcando Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina. Constituyen uno de los principales componentes de la comunidad béntica de la cuenca del Río Paraná, donde alcanzan densidades poblacionales de hasta 1500 individuos/m² (Lemaire-Goni y Boudou, 1997; Vidal *et al.*, 2002, Rumi *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2007).

Como características generales, *C. fluminea* posee conchillas equivalvas gruesas y resistentes, de forma redondeada y color amarillo a marrón. La superficie externa presenta surcos ovalados y concéntricos bien marcados. Son individuos hermafroditas con capacidad de autofecundación, lo que les otorga un alto potencial reproductivo. Tienen forma de vida infaunal, enterrándose en sustratos blandos y presentan un número cromosómico diploide de $2n=54$ (Doherty, 1990; Araujo *et al.*, 1993, Park *et al.*, 2000).

Entre los bivalvos de agua dulce que han sido empleados en trabajos de campo y bioensayos en laboratorio, *C. fluminea* se ha destacado notablemente tanto en sus estadios juveniles como adultos (Cataldo *et al.*, 2001; Cherry y Soucek, 2007). Reúnen además condiciones que los convierten en buenos organismos centinela, ya que se encuentran ampliamente distribuidos; son pequeños (3-4 cm de longitud valvar máxima) y fáciles de mantener en laboratorio; tienen tasas elevadas de filtración en relación a otros bivalvos de agua dulce (superiores a 2,5 lt/h); su periodo de vida es relativamente corto (1 a 3 años); son organismos de movilidad limitada y sensibles a las condiciones ambientales (Doherty,

1990; Darrigran y Coppola, 1994; Graczyk *et al.*, 1997; Cataldo *et al.*, 2001; Cherry y Soucek, 2007).

Las propiedades de *C. fluminea* como bioindicador han sido demostradas por su capacidad para bioacumular compuestos organoclorados y metales pesados, como también de responder ante la presencia de contaminantes ambientales a través de diversos biomarcadores evaluados en diferentes tejidos del organismo (Doherty, 1990; Bilos *et al.*, 1998; Cataldo *et al.*, 2001; Vidal *et al.*, 2002; Tran *et al.*, 2004; Rigonato *et al.*, 2005; Caffetti *et al.*, 2008; Tran *et al.*, 2008).

IX.3 *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)

Limnoperna fortunei, también conocida como mejillón dorado, representa otra de las especies exóticas provenientes del Sudeste asiático que ingresan a Sudamérica en la década de 1990, a través del Estuario del Río de la Plata. Desde entonces, ha colonizado rápidamente la mayor parte de la cuenca del Plata, haciendo su ingreso al Río Paraná en el año 1996 y expandiéndose hacia Brasil (Avelar *et al.*, 2004; Darrigran y Damborenea, 2006; Rumi *et al.*, 2007; Cataldo *et al.*, 2012).

Estos bivalvos pertenecen al Orden Mytiloidea, Familia Mytilidae. En América, esta familia sólo tiene formas nativas marinas y estuariales, por lo cual *L. fortunei* es el único representante dulceacuícola a pesar de su naturaleza invasora.

Se caracterizan por ser organismos equivalvos, cuya coloración va desde marrón oscuro hasta amarillo dorado, lo que le otorga el nombre vulgar de mejillón dorado. Las valvas son delgadas, de forma ovalada y tienen una longitud total máxima de 3,5 cm. en promedio. Su modo de vida es epifaunal, poseen un órgano especial denominado biso el cual, junto a la forma de las valvas, le permite adherirse fuertemente a toda superficie dura, tanto inerte como sobre otros organismos (Darrigran y Damborenea, 2006). Los adultos son dioicos y las larvas son de vida libre, con gran capacidad de dispersión a través de las aguas. Los ecosistemas acuáticos locales han sido muy favorables para su reproducción y expansión, en especial la cuenca del Río Paraná, donde pueden alcanzar densidades de hasta 300.000 individuos/m² (Avelar *et al.*, 2004; Cataldo *et al.*, 2005; Rumi *et al.*, 2007).

Por todo lo mencionado, esta especie ha tenido gran impacto ambiental debido al *macrofouling*, es decir, las incrustaciones de estos organismos que obstruyen las tomas de agua y las centrales hidroeléctricas; por alterar la dieta de varias especies nativas de peces y por provocar una disminución de la malacofauna, no sólo al competir con especies

nativas, sino también por asentarse sobre las valvas de otras especies, impidiéndoles la apertura de sus valvas (Darrigran y Damborenea, 2006; Paolucci *et al.*, 2010).

Por otra parte, las características del mejillón dorado tales como excelente adaptación, amplia distribución, fácil obtención, disponibilidad a lo largo del año y su ciclo de vida relativamente corto (aproximadamente 3 años), lo convierte en buen organismo centinela. Al igual que otros bivalvos exóticos, *L. fortunei* ha sido utilizado en estudios de biomonitoreo de ambientes dulceacuícolas *in situ* y en laboratorio, mostrando en ambos casos ser un bioindicador adecuado (Belaich *et al.*, 2006; Villela *et al.*, 2006; Villela *et al.*, 2007).

X CÉLULAS CHO-K1 COMO MODELO *IN VITRO* EN ENSAYOS DE GENÉTICA TOXICOLÓGICA

Los sistemas *in vitro* en estudios ecotoxicológicos ofrecen la oportunidad no sólo de extrapolar algunos resultados a los sistemas *in vivo*, sino también de brindar información acerca de las respuestas biológicas en niveles superiores de organización mediante el empleo de líneas celulares de mamíferos (Jha, 2004).

En la segunda mitad de los años 1980, el modelo experimental *in vitro* comenzó a ser ampliamente utilizado en toxicología, dando surgimiento a la “toxicología *in vitro*” propiamente dicha. El uso de cultivos celulares en test de toxicidad y/o *screening*, implicó una reducción de tiempos y costos en los estudios de evaluación de riesgo de los numerosos compuestos que ingresan anualmente al mercado. En este contexto, dos grupos principales de sistemas *in vitro* comenzaron a ser utilizados en Genotoxicología: ensayos con bacterias y cultivo de células de mamíferos (Jha, 2004; Zucco *et al.*, 2004).

A comienzos de 1990, con el desarrollo de la guía de la Organización para el Desarrollo y la Cooperación Económica (OECD) para ensayos de genotoxicidad con células de mamíferos *in vitro*, se dio un crecimiento importante en el área, poniendo de manifiesto la sensibilidad de este tipo de ensayos con la detección del 80-90% de los carcinógenos conocidos (OECD, 2010; Galloway *et al.*, 2011, Kirsch-Volders *et al.*, 2011).

Entre los numerosos modelos de células de mamíferos empleadas *in vitro*, se destacan las células CHO y CHO-K1. Ambas corresponden a líneas celulares derivadas de Ovario de Hámster Chino (*Cricetulus griseus*), siendo las CHO-K1 una línea ancestral de tipo “salvaje”. Estas líneas celulares tienen la ventaja de presentar pocos cromosomas ($2n=20-22$), por lo cual han sido comúnmente usadas en ensayos de aberraciones

cromosómicas. Adicionalmente, crecen con facilidad sin requerir estimulación mitogénica, están disponibles fácilmente y no presentan variabilidad de acuerdo al donante como ocurre con los linfocitos humanos (Aardema *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2012).

Daños genéticos puntuales (mutaciones), eventos clastogénicos y eventos aneugénicos han sido detectados en células CHO expuestas a diversos efluentes industriales. Del mismo modo, estudios de mecanismos y efectos tanto genotóxicos como antigenotóxicos de herbicidas, insecticidas y extractos derivados de diferentes compuestos, han sido testeados en cultivos *in vitro* de células CHO-K1 (Houk, 1992; Bayoumi *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2003; Pereira Machado *et al.*, 2005; Bellini *et al.*, 2006; Bellini *et al.*, 2008, González *et al.*, 2011).

XI ENSAYO COMETA

Debido al hecho de que los contaminantes con efectos genotóxicos usualmente ingresan a los cuerpos de agua como componentes de mezclas complejas, donde las interacciones entre las distintas sustancias pueden alterar sus propiedades y a que dichas sustancias suelen encontrarse por debajo de los límites de detección a concentraciones muy bajas, surgió la necesidad de desarrollar métodos sensibles que permitieran detectar y cuantificar tempranamente los daños provocados a nivel del material genético como biomarcador (Avisahi *et al.*, 2002; Baršienė *et al.*, 2010).

La principal ventaja de estos métodos es que no requieren un conocimiento detallado de la identidad y las propiedades fisicoquímicas de los contaminantes en cuestión (Mitchellmore y Chipman, 1998, Zhu *et al.*, 2005; Frenzilli *et al.*, 2009).

Entre las técnicas disponibles para evaluar daños en el ADN, el Ensayo Cometa ó Electroforesis en Gel de Células Aisladas (SCGE por sus siglas en inglés), se ha convertido desde hace varias décadas en uno de los métodos de elección.

Este ensayo fue descrito inicialmente por Östling y Johanson en 1984, como una técnica de electroforesis en microgel para detectar daños en el ADN a nivel de células aisladas. El método original se basaba en electroforesis bajo condiciones neutras de pH, que permitían detectar únicamente roturas de doble cadena en el ADN. Posteriormente, en 1988, Singh *et al.* introdujeron una modificación a la técnica basada en la incorporación de electroforesis bajo condiciones alcalinas (pH>13). Esta versión alcalina del ensayo cometa hizo posible poner en evidencia, además de las roturas de doble cadena, roturas de cadena simple del ADN inducidas en forma directa, y cualquier lesión que pueda convertirse en

rotura de simple cadena bajo condiciones alcalinas, como ser sitios lábiles a los álcalis. Además de este tipo de daños inducidos en forma directa que pueden generar alteraciones cromosómicas, otros eventos son capaces de introducir modificaciones a nivel de las bases del ADN y generar sitios abásicos (por ejemplo sitiosapurínicos), que ocurren como procesos intermediarios durante la reparación del daño, como es el caso de la reparación por escisión incompleta. Estas modificaciones, que pueden conducir a mutaciones génicas, también son detectadas por el ensayo cometa alcalino (Fairbairn *et al.*, 1995, Rojas *et al.*, 1999; Brendler-Schwaab *et al.*, 2005; Speit y Rothfuss, 2012).

Dado que las clases más comunes de daños inducidos por los agentes genotóxicos presentes en el agua, involucran roturas de simple cadena y sitios lábiles a los álcalis en la molécula del ADN, esta versión alcalina incrementó notablemente la sensibilidad de detección del ensayo, siendo actualmente la más recomendada en la identificación de agentes con actividad genotóxica (Fairbairn *et al.*, 1995; Collins *et al.*, 1997; Tice *et al.*, 2000).

Los principios del ensayo se fundamentan en la estructura y organización del ADN dentro del núcleo, a modo de una serie de “loops” de la doble hélice del ADN superenrollado en torno a las proteínas histónicas del nucleosoma. En este contexto, si las células objeto de estudio son retenidas en un gel de agarosa sobre portaobjetos y sometidas a una solución de lisis con elevadas concentraciones salinas y detergentes, se logra remover las membranas celulares, el citoplasma y el nucleoplasma. De esta manera, se interrumpe la estructura del nucleosoma al solubilizar todas las proteínas histónicas presentes. La estructura resultante se denomina nucleoide y consiste en una serie de asas superenrolladas de ADN desprovisto de histonas y adherido a una matriz nuclear residual del tamaño del núcleo original de la célula. Posteriormente, si el ADN es desnaturalizado en una solución alcalina por un periodo de tiempo suficiente, la presencia de quiebres o roturas en sus cadenas provocarán una relajación del superenrollamiento en su estructura. Cuanto mayor sea el número de roturas producidas en las hebras del ADN, mayor será el grado de relajación de las mismas. Al someter estos nucleoides a electroforesis, el ADN negativamente cargado migrará desde el nucleoide hacia el ánodo. Luego de neutralizar y fijar los preparados, la tinción con colorantes fluorescentes de unión específica al ADN, revelará imágenes similares a “cometas”, característica que le otorga el nombre a la técnica. Por lo tanto, la habilidad del ADN para migrar y originar los cometas, dependerá tanto del tamaño como del número de roturas ocurridas en sus hebras. Cuanto mayor sea el daño, más larga e intensamente coloreada se verá la cola de los cometas en relación con la

cabeza de los mismos (Fairbairn *et al.*, 1995; Gontijo y Tice, 2003; Lee y Steinert, 2003; Collins, 2004).

El análisis de 100 nucleoides por preparado a través de programas informáticos específicos, o bien mediante examen visual directo, permite clasificarlos en clases de cometas asignándoles un valor de 0 a 4 de acuerdo al grado de daño que presenten. De esta manera, el índice total de daño por muestra adquiere un valor arbitrario entre 0 y 400 (Collins *et al.*, 1997; Collins, 2004).

Las principales ventajas de esta técnica en relación a otros ensayos genotóxicos son (Fairbairn *et al.*, 1995; Collins *et al.*, 1997; Mitchelmore y Chipman, 1998; Rojas *et al.*, 1999; Tice *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2008):

- Su demostrada sensibilidad para detectar niveles mínimos de daño en el ADN (resuelve poco más de 1.000 roturas por célula, a razón de una rotura por cada 10^9 Daltons).

- Su simplicidad y versatilidad.

- El poco tiempo necesario para completar el ensayo.

- Su costo relativamente bajo.

- El requerimiento de un número escaso de células por muestra.

Además, es posible incorporar al estudio virtualmente cualquier tipo de célula eucariota, permitiendo la detección de daños en el ADN de células no proliferantes.

El ensayo cometa constituye así una herramienta muy útil para la detección de un amplio espectro de lesiones primarias en numerosos modelos biológicos tanto *in vivo* como *in vitro*, combinando la simplicidad de las técnicas bioquímico-moleculares con el abordaje de células aisladas, característico de los ensayos citogenéticos (Cotelle y Férard, 1999; Tice *et al.*, 2000; Jha, 2008; Speit y Rothfuss, 2012).

Sus ventajas lo han convertido en una herramienta básica en numerosos campos de investigación que abarcan desde la Genética Toxicológica y Ecotoxicológica, pasando por aplicaciones clínicas, epidemiología molecular y biomonitorio humano, hasta el biomonitorio ambiental (Fairbairn *et al.*, 1995; Mitchelmore y Chipman, 1998; Cotelle y Férard, 1999; Rojas *et al.*, 1999; Kassie *et al.*, 2000; Avishai *et al.*, 2002; Lee y Steinert, 2003; Matsumoto *et al.*, 2003; Collins, 2004; Brendler-Schwaab *et al.*, 2005; Giacomini Lemos *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005; Caffetti *et al.*, 2008; Jha, 2008; Frenzilli *et al.*, 2009; Hartmann y Speit, 2009; Rigonato *et al.*, 2010; Speit y Rothfuss, 2012).

XII TEST DE MICRONÚCLEOS Y ALTERACIONES DE LA MORFOLOGÍA NUCLEAR

Las microlesiones en el ADN, tales como roturas de doble y simple cadena resultantes de la exposición a sustancias genotóxicas que no son reparadas correctamente por las células, pueden conducir a macrolesiones que involucran alteraciones cromosómicas. Las mismas se expresan durante la división celular y representan un índice de efectos genotóxicos acumulativos muy útiles como biomarcadores de efecto.

Entre las técnicas citogenéticas disponibles para la detección de alteraciones cromosómicas se encuentran: Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH), ensayo de Aberraciones Cromosómicas en metafase y anafase (AC) y Test de Micronúcleos (MN) (Dixon *et al.*, 2002; Lee y Steinert, 2003; Zhu *et al.*, 2005; Bolognesi *et al.*, 2006).

Debido a la simplicidad y rapidez del Test de Micronúcleos (MN), el mismo se convirtió en una de las técnicas citogenéticas más aplicadas durante los últimos años para evaluar daños cromosómicos en diferentes organismos (Schmid, 1977; Mersch y Beauvais, 1997; Hayashi *et al.*, 1998; Fenech *et al.*, 2003; Baršienė *et al.*, 2006; Frenzilli *et al.*, 2009; Bolognesi y Hayashi, 2011).

Los Micronúcleos son pequeños cuerpos extranucleares de cromatina que se expresan en células en división y que pueden originarse por alguno de los siguientes mecanismos:

- ✓ A partir de quiebres cromosómicos que dan lugar a fragmentos cromatídicos o cromosómicos acéntricos.
- ✓ A partir de cromosomas completos que no alcanzan los polos del huso mitótico durante la división celular.

Durante la telofase, cuando se reconstituye la envoltura nuclear en torno a las dos células hijas resultantes, estos cromosomas o fragmentos que permanecieron rezagados, no se incorporan al núcleo principal de la célula sino que son encapsulados en un núcleo separado y de tamaño mucho menor, denominado micronúcleo (Miller, 1973; Schmid, 1977; Mersch y Beauvais, 1997; Ali *et al.*, 2008; Kirsch-Volders *et al.*, 2011). Por lo tanto, el test de MN permite evaluar alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas causadas por agentes tanto clastogénicos como aneugénicos, respectivamente (Mersch *et al.*, 1996; Natarajan, 2002; Çavaş y Gözükar, 2005; Utani *et al.*, 2010).

Si bien se considera que los micronúcleos se originan durante la anafase/telofase por roturas en el ADN o defectos de unión al huso mitótico durante el proceso de segregación

(defectos de las fibras de tubulina, de los centrómeros y/o cinetocoros), también se ha sugerido que los mismos pueden originarse por extrusión de genes amplificados durante la fase S del ciclo celular (Kirsch-Volders *et al.*, 2011).

El test de MN fue descrito independientemente por Heddle en 1973 y por Schmid en 1975, como una técnica citogenética para evaluar daños cromosómicos *in vivo* causados por sustancias físicas y químicas en pequeños roedores. Desde entonces, su aplicación en eritrocitos de sangre periférica y médula ósea de pequeños mamíferos, se constituyó en uno de los ensayos citogenéticos mejor establecidos en el campo de la Genética Toxicológica, siendo incorporado a los estándares de evaluación mutagénica por diversas autoridades regulatorias internacionales (Fenech, 2000; Natarajan, 2002; Heddle *et al.*, 2011).

De la misma manera, la validación de protocolos para el test de MN *in vitro* progresó rápidamente mediante estudios colaborativos internacionales que han llevado a su aplicación como parte de baterías de ensayos de genotoxicidad con fines regulatorios, y como una alternativa al ensayo de aberración cromosómica *in vitro*. Los tipos celulares más utilizados en este sentido son los linfocitos humanos y las células CHO tanto en el ensayo de MN por bloqueo de la citocinesis con citocalasina B, como en el test de MN tradicional (Decordier y Kirsch-Volders, 2006; ECVAM, 2006; Lorge *et al.*, 2006; Aardema *et al.*, 2006; OECD, 2010).

Actualmente, alrededor de 6.000 trabajos han sido publicados utilizando el test de MN en diversos tejidos *in vivo* o en cultivos celulares *in vitro* (Heddle *et al.*, 2011).

Debido a que este ensayo puede aplicarse a células en interfase provenientes de cualquier población celular proliferante, independientemente de su cariotipo, ha sido exitosamente adaptada para su aplicación en varios organismos acuáticos, especialmente peces y moluscos, cuyos cromosomas pequeños y numerosos dificultan notablemente la aplicación de otras técnicas citogenéticas (Hooftman y de Raat, 1982; Venier *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 1998; Bolognesi *et al.*, 2006; Frenzilli *et al.*, 2009; Bolognesi y Hayashi, 2011).

Dadas las ventajas mencionadas, el test de MN se ha convertido en un biomarcador muy utilizado en programas de monitoreo para evaluar la calidad de los ambientes acuáticos y los efectos genotóxicos de diversos efluentes. Se han determinado incrementos en las frecuencias de micronúcleos en peces y moluscos tanto en condiciones de laboratorio como a campo, relacionadas con el impacto genotóxico causado por diversos contaminantes y efluentes presentes en los cuerpos de agua evaluados (Al-Sabti y Hardig, 1990; Mersch y Beauvais, 1997; Venier *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 1998; Dixon *et al.*, 2002; Izquierdo *et al.*, 2003; Mallick y Khuda-Bukhsh, 2003; Çavaş y Gözükar, 2005;

Venier y Zampieron, 2005; Souza y Fontanetti, 2006; Ali *et al.*, 2008; Šrut *et al.*, 2010; Baršienė *et al.*, 2010; Bolognesi y Hayashi, 2011; Omar *et al.*, 2012; Baršienė *et al.*, 2013; Beyer *et al.*, 2013).

Por otra parte, además de los micronúcleos, también se ha documentado la presencia de otras alteraciones de la morfología nuclear en células de peces y moluscos expuestos a sustancias químicas o aguas contaminadas. En conjunto, estas variaciones reciben el nombre de Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) y constituyen un análisis complementario al test de MN como indicadores de inestabilidad genética en ensayos genotóxicos (Çavaş y Gözükar, 2005; Baršienė *et al.*, 2006; Souza y Fontanetti, 2006; Costa y Costa, 2007; Baršienė *et al.*, 2008; Utani *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 2011; Basu y Guha, 2012; Baršienė *et al.*, 2013).

Estas AMN pueden clasificarse en: núcleos globulares o *blebbed* (pequeñas evaginaciones de la envoltura nuclear); núcleos lobulados o *lobed* (protuberancias de la envoltura nuclear mayores que las encontradas en los núcleos globulares); núcleos con muescas o *notched* (hendiduras apreciables que le otorgan a los núcleos una morfología tipo arriñonada); núcleos con gemaciones o *buds* (presencia de gemaciones que se mantienen unidas al núcleo principal); núcleos en forma de ocho o *eightshaped*; células binucleadas; núcleos vacuolados y/o fragmentados y presencia de puentes cromatínicos.

Si bien los mecanismos que conducen a estas AMN aún no se conocen en detalle, se sabe que algunas de ellas se relacionan a fallas durante la división celular como en el caso de las gemaciones, los puentes cromatínicos y las células binucleadas o a procesos relacionados con la apoptosis, como ocurre con los núcleos fragmentados (Carrasco *et al.*, 1990; Venier *et al.*, 1997; Fenech, 2000; Fenech *et al.*, 2011; Baršienė *et al.*, 2013).

XIII RELEVANCIA DEL USO DE BIOMARCADORES GENÉTICOS Y ORGANISMOS INDICADORES EN PROGRAMAS DE MONITOREO AMBIENTAL Y CONTROL DE EFLUENTES

La aprobación del Acta de Agua Limpia (CWA) durante 1972 en EUA, dio origen a la regulación de emisiones de sustancias tóxicas en aguas superficiales y tuvo un impacto importante en la Ingeniería Ambiental y la Toxicología Acuática, llevando a la elaboración de pautas formales para establecer los criterios de calidad del agua. Estos criterios constituyeron los primeros datos científicos acerca de las concentraciones químicas

máximas permitidas para la protección de la vida acuática y del agua para uso recreativo humano (Adams y Rowland, 2003; Ohe *et al.*, 2004).

Comienzan a surgir entonces los programas de monitoreo ambiental con la implementación de organismos indicadores para identificar en los ríos y otros ambientes acuáticos, aquellas áreas en donde las concentraciones de contaminantes producto de la actividad antrópica fueran elevadas. Estos programas de investigación llevados a cabo por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de EUA y por la OECD, tienen como objetivo desarrollar herramientas científicas que permitan trasladar los datos del monitoreo ambiental a evaluaciones del estado ecológico y las previsiones del riesgo futuro para la sustentabilidad de los recursos naturales (OECD, 1998; Breckenridge *et al.*, 2003; Holl y Cairns, 2003; Kienzl *et al.*, 2003).

Actualmente, la mayor parte de los países desarrollados como por ejemplo EUA, Canadá, Australia y los países de la Unión Europea, incluyen aplicaciones de ensayos toxicológicos para el control de efluentes tanto industriales como urbanos con fines investigativos y regulatorios. Si bien los datos exigidos con fines regulatorios varían entre las distintas jurisdicciones, en su mayoría involucran estudios basados en bioensayos con muestras de efluentes o del ambiente receptor de los mismos. Estos bioensayos se basan generalmente en la aplicación de test de toxicidad aguda para evaluar diferentes parámetros biológicos (bioacumulación en tejidos y daños genotóxicos) en organismos indicadores *in vivo*, o en ensayos *in vitro*. En este sentido, la EPA de EUA y la Agencia Ambiental de Canadá, han estandarizado los ensayos de toxicidad aguda para peces e invertebrados (Adams y Rowland, 2003; Power y Boumphrey, 2004).

Si bien es difícil establecer la relación precisa entre los efectos ecológicos y la salud humana, el empleo de especies centinela constituye la base conceptual para esta conexión. Adicionalmente, los estudios genéticos que se condujeron con algunas de estas especies en ambientes contaminados, demostraron que la exposición a determinadas sustancias químicas causa daño genético. Debido a que estos daños se manifiestan originalmente a nivel molecular y celular, sus efectos emergentes son visibles sólo a niveles superiores de organización biológica y no pueden predecirse únicamente en base al mecanismo de acción intrínseco de la sustancia en cuestión. Por ello, el análisis de alteraciones en el ADN de organismos acuáticos mediante técnicas de alta sensibilidad como los ensayos cometa y de MN, constituyen un método promisorio para monitorear la contaminación de los cuerpos de agua y ha sido utilizado como una herramienta integral en la evaluación de riesgo de aguas superficiales que contienen mezclas complejas de contaminantes. De hecho, la

determinación de la potencia y la cuantificación de mutágenos y/o carcinógenos en aguas superficiales, es uno de los objetivos más importantes de la evaluación de riesgo genético (Houk, 1992; Bickham *et al.*, 2000; Ohe *et al.*, 2004).

En los países en desarrollo, el uso de bioensayos para la evaluación de efluentes con fines regulatorios es prácticamente inexistente. En el caso particular de Sudamérica, son utilizados como parte de políticas de Investigación y Desarrollo (I+D) en el sector público o privado y en casos aislados para la evaluación de muestras ambientales.

La falta de investigación en estos aspectos es evidente a nivel de la cuenca del Alto Paraná en territorio argentino, ante la ausencia de datos y estudios relacionados al impacto biológico de la contaminación ambiental.

Por su parte, el sector político y administrativo necesitan generar información acerca de la calidad ambiental para emplear este conocimiento ya sea como un sistema de alerta temprana en la detección de daños, o bien para realizar un seguimiento de los programas de remediación ambiental. Para ello, la información obtenida mediante estudios integrados de análisis químicos y aplicación de múltiples biomarcadores en diferentes organismos, puede aportar una visión holística del impacto toxicológico de los contaminantes ambientales. Sin dudas, el análisis de la respuesta biológica de los organismos constituye una parte fundamental en la evaluación del riesgo tanto para la salud humana como para el ecosistema acuático (Kienzl *et al.*, 2003; Jha, 2008).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



HIPOTESIS DE TABAJO

El Río Paraná es un importante receptor de efluentes domiciliarios, agrícolas e industriales con potencialidad genotóxica y que afectan de manera no bien conocida el material genético de los organismos que habitan sus aguas, siendo sus efectos pasibles de evaluación mediante técnicas específicas de monitoreo. Siendo las especies seleccionadas sensibles a los agentes genotóxicos, representan buenos organismos centinela debido a sus características ecológicas y etológicas.

OBJETIVOS

Objetivos Generales:

Establecer sistemas de monitoreo para la evaluación de los posibles efectos genotóxicos de contaminantes vertidos al Río Paraná en diversos modelos biológicos, que permitan identificar especies centinela apropiadas para estudios de alteraciones en el material genético.

Objetivos Específicos:

Para detectar los posibles efectos de los contaminantes fluviales, se propuso realizar un estudio de monitoreo ambiental en aguas del Río Paraná que permitiera:

- Detectar el potencial genotóxico de muestras de agua del río Paraná mediante el análisis de micronúcleos y alteraciones nucleares en células de hemolinfa, empleando como especies centinela *Corbicula fluminea* y *Limnoperna fortunei*.

- Evaluar el potencial genotóxico de muestras de agua del río Paraná mediante la técnica de ensayo cometa *in vivo*, utilizando como material biológico hemocitos de las especies *Corbicula fluminea* y *Limnoperna fortunei*.

- Analizar la genotoxicidad de muestras de agua del río Paraná mediante tratamiento directo *in vitro* de células CHO (células de ovario de hámster chino) evaluadas por ensayo cometa y test de micronúcleos.

- Cuantificar los posibles daños en el ADN causados por muestras de agua del río Paraná en eritrocitos del género nativo *Steindachnerina brevipinna* (Pisces, Curimatidae) mediante las técnicas de ensayo cometa, test de micronúcleos y alteraciones de la morfología nuclear.

- Estimar la recuperación de daños en el material genético de los tres modelos biológicos (*Steindachnerina brevipinna*, *Corbicula fluminea* y *Limnoperna fortunei*) evidenciados mediante las técnicas de ensayo cometa y micronúcleos, a fin de demostrar la posible reversión de esta condición y la sensibilidad de los organismos frente a cambios inmediatos en su entorno.

- Determinar cuál de las especies centinela empleadas se ajusta mejor a los requerimientos de estudios experimentales de biomonitoreo.

The top portion of the page features a decorative orange sunburst graphic. The sunburst originates from a central point on the right side of the page and radiates outwards to the left, creating a series of thin, overlapping lines that form a fan shape. The color of the sunburst transitions from a light, pale orange on the left to a darker, more saturated orange on the right.

MATERIALES Y MÉTODOS

I SITIOS Y ÉPOCAS DE MUESTREO

Para el desarrollo de los estudios de genotoxicidad, las muestras de agua a ser evaluadas fueron obtenidas entre los meses de abril y noviembre durante tres años consecutivos: 2009, 2010 y 2011.

Dichas muestras procedieron de cuatro sitios diferentes a lo largo del Río Paraná, receptores de efluentes de diversa calidad y situados en sentido Norte-Sur sobre la provincia de Misiones (ver mapa a continuación):

I.1.- Iguazú (progresiva km 1920): localizada en el extremo norte de la provincia y próxima a los límites internacionales con las Repúblicas de Paraguay y Brasil. Es sede, además, de las Cataratas homónimas que desembocan en el Río Iguazú, importante afluente del Río Paraná. En el año 2011 la ciudad de Puerto Iguazú habilitó la red y planta de tratamiento de líquidos cloacales en las afueras de la ciudad, desde donde los residuos se dirigen en última instancia al Río Paraná, distante aproximadamente 4,6 km aguas abajo del sitio de muestreo seleccionado. El sistema está capacitado hasta el momento para procesar los desechos domiciliarios del 50% de la población, constituida actualmente por unos 100.000 habitantes. Anteriormente, los líquidos residuales eran evacuados en forma cruda al parque denominado “Honorio Rolón” con salida directa al Río Iguazú, distante 1,5 km de su desembocadura en el Río Paraná. El tramo comprendido desde el sitio de descarga mencionado hasta el sitio elegido para la toma de muestras sobre el Río Paraná es de 3,5 km aguas abajo, incluyendo el trayecto recorrido sobre el Río Iguazú. No se cuenta con registros de otros efluentes importantes que tengan como destino directo el Río Paraná a esta altura (Coordenadas: 26°28'43,6''S y 54°35'33,1''O).

I.2.- Puerto Piray (progresiva km 1800): sitio receptor de efluentes de una industria papelerá dedicada a la fabricación de papel y pulpa al sulfito, cuya tecnología de blanqueo utiliza cloro elemental. Su capacidad productiva se encuentra entre las menores en relación a otros establecimientos de esta índole y es considerada prácticamente obsoleta. No cuenta con sistema alguno para el tratamiento de efluentes, los cuales son vertidos en crudo al denominado arroyo “Angelito” unos pocos metros antes de su entrada al Río Paraná. La planta comenzó sus actividades en el año 1942 con perspectivas a una producción anual de 130.000 toneladas, pero debido a problemas económicos y de conducción, desde hace varios años su funcionamiento es irregular y atraviesa periodos de inactividad. Esto último

se debe principalmente a que desde el año 2003 afronta cuestiones legales con el Ministerio de Ecología de la provincia de Misiones en relación con su infracción a la Ley 24.051 de residuos peligrosos.

Durante el primer muestreo realizado en junio de 2009, la planta se encontraba inactiva debido a la clausura temporaria realizada por el Ministerio de Ecología de la provincia de Misiones. Esta situación revirtió posteriormente en los muestreos realizados durante los años 2010 y 2011, encontrándose la planta en pleno funcionamiento (Coordenadas: 26°28'19,6''S y 54°43'35,6''O).

I.3.- Puerto Mineral (progresiva km 1715,5): sitio perteneciente al Municipio de Capioví y ubicado aproximadamente 2,3 km aguas abajo de una industria papelerera dedicada a la fabricación de papel y pulpa kraft, que emplea para el blanqueo tecnología totalmente libre de cloro (TCF). Esta papelerera alcanzó en el año 2004 una producción de 90.000 toneladas anuales con vistas a duplicarla y en la actualidad se convirtió en una de las más productivas de la rama en el país. Los efluentes industriales son evacuados a un pequeño arroyo tributario, pocos centenas de metros antes de su desembocadura en el Río Paraná. La zona que recibe la descarga directa de los efluentes fue inaccesible para la toma de muestras. La industria, que funciona de manera ininterrumpida desde el año 1975, cuenta con planta de tratamientos líquidos aunque aún no ha optimizado su funcionamiento (Coordenadas: 26°57'16,1''S y 55°08'17,1''O).

I.4.- Posadas (progresiva km 1573,5): sitio correspondiente a la capital de la provincia y situada en su extremo sur. Recibe importantes desechos fluviales y urbanos. El sitio escogido para la toma de muestras, denominado Club Luz y Fuerza, se encuentra aproximadamente 1 km aguas arriba del emisario de descarga de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad. Si bien la planta de tratamiento fue construida en la década de 1990, durante muchos años los desechos urbanos fueron descargados en forma directa al Río Paraná luego de un tratamiento primario de decantación. Recién a comienzos del año 2000 comenzaron a operar las obras del sistema de colección y tratamiento de líquidos cloacales, que consisten en una serie de estaciones elevadoras con sistema de *by pass* conectados a cursos naturales, todos ellos afluentes directos del Río Paraná. Si bien el sitio de muestreo seleccionado se sitúa aguas arriba de la planta de tratamiento de la ciudad, se sabe que en los casos en que las plantas elevadoras no funcionan, un 80% de los desechos urbanos se dirigen a los cursos naturales, tres de los cuales están ubicados aguas

arriba en un trayecto de aproximadamente 5 km sobre el Río Paraná (Coordenadas: 27°21'35,3''S y 55°57'22,1''O).

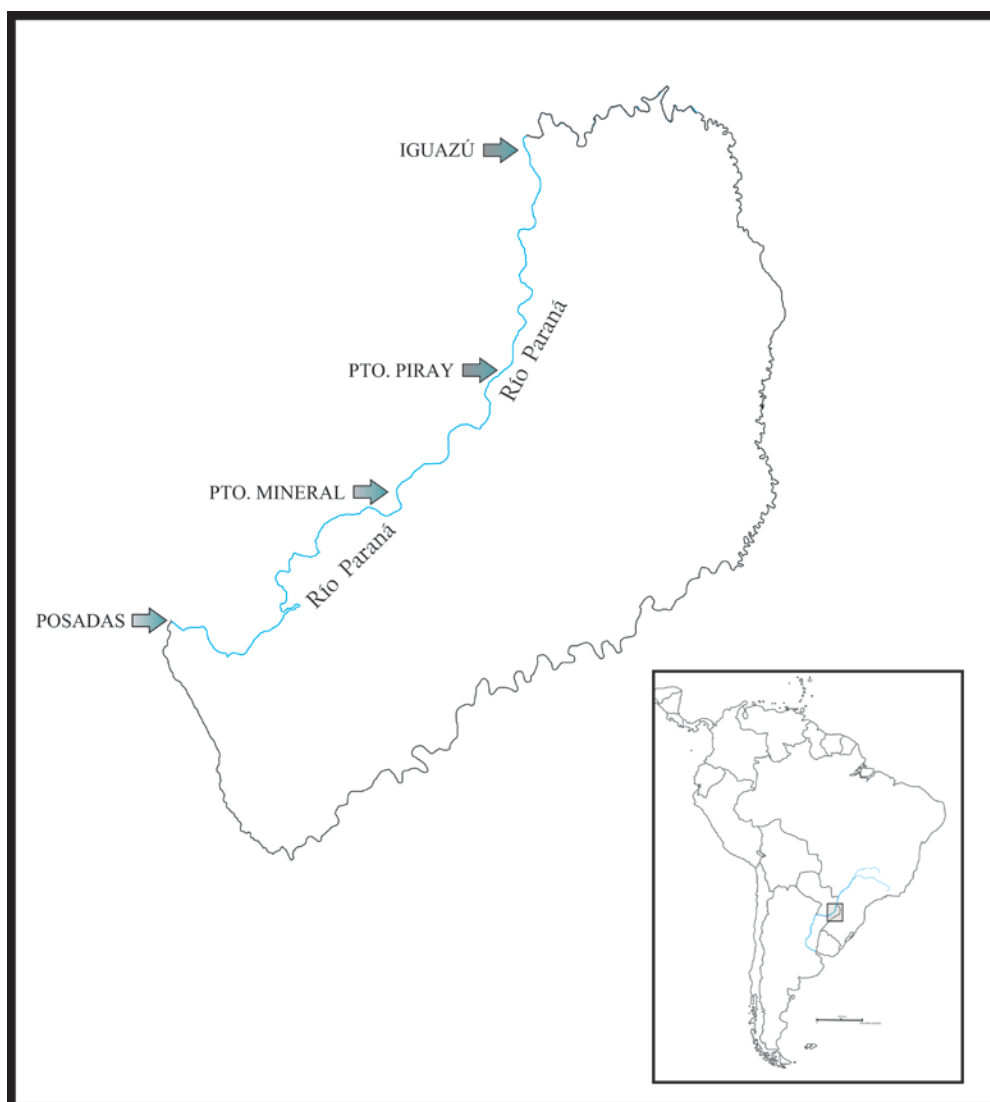


Figura 1. Área de estudio donde se localizan los cuatro sitios de muestreo sobre el Río Paraná a lo largo de la provincia de Misiones (Argentina).

Las muestras de agua obtenidas fueron caracterizadas desde el punto de vista físico-químico y trasladadas al laboratorio para el montaje de bioensayos de exposición de los organismos propuestos como bioindicadores, tanto *in vivo* como *in vitro*, con el objeto de evaluar su potencialidad genotóxica a través de biomarcadores de efecto y técnicas pertinentes de Genética Toxicológica: Ensayo Cometa, Test de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN).

Independientemente, se analizaron las variaciones de los niveles y caudales del Río Paraná en base a los registros mensuales y anuales para el período de estudio 2009-2011

obtenidos a partir del hidrómetro de la ciudad de Posadas (Misiones) y cedidos por Prefectura Naval Argentina y por la Entidad Binacional Yacyretá (EBY) en el marco del convenio EBY-CECYT-CONICET (2012).

II ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

Se tomaron las muestras de agua de río correspondientes a cada uno de los sitios mencionados anteriormente y se analizaron para cada uno de ellos los siguientes parámetros fisicoquímicos:

- ✓ Temperatura del agua *in situ* (°C)
- ✓ Temperatura ambiente *in situ* (°C)
- ✓ Oxígeno disuelto *in situ* (mg/l)
- ✓ pH *in situ* (UpH)
- ✓ Conductividad (µS/cm)
- ✓ Nitrógeno orgánico total (NOT) (mg/l)
- ✓ Nitrógeno de nitratos (mgN/l)
- ✓ Nitrógeno de nitritos (mgN/l)
- ✓ Nitrógeno amoniacal (mgN/l)
- ✓ Fósforo total (mgP/l)
- ✓ Ortofosfato disuelto (mgPO₄⁼/l)
- ✓ Alcalinidad total (mgCO₃Ca/l)
- ✓ Dureza total (mgCO₃Ca/l)
- ✓ Turbiedad (NTU)
- ✓ Fenoles (mg/l)
- ✓ Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) (mgO₂/l)

Las determinaciones de los parámetros se hicieron de acuerdo a las técnicas de APHA *et al.* (1989).

Para mediciones de pH, temperatura y conductividad se utilizó equipo de medición de pH y conductividad marca YSI – Modelo 63. En tanto el NOT, los N-Nitratos, N-Nitritos, N-Amoniacal, Fósforo total, Ortofosfatos y Sustancias fenólicas se realizaron por espectrofotometría en espectrofotómetro UV-Visible SHIMADZU UV 1601.

El Oxígeno Disuelto fue estimado mediante método electrométrico con medidor de Oxígeno marca YSI -Modelo 50B; en tanto el OD inicial y final fueron evaluados por el método de Winckler (azida sódica).

Las evaluaciones de turbiedad se realizaron con un turbidímetro marca PARSEC-TRITÓN-Modelo 520.

El análisis de las DBO₅ fue efectuado mediante método de dilución e incubación de la muestra en oscuridad y a temperatura constante de 20 ± 1 °C, en incubadora Vickingmod 3842 LC (modificada).

Las mediciones de Alcalinidad y Dureza total se realizaron por métodos titulométricos, utilizándose microburetas IVA de 10 ml (graduación 1/50).

A partir de los datos obtenidos de los análisis fisicoquímicos, se elaboró un Índice de Calidad de Agua (ICA) debido a la falta de índices representativos para la región. Para la conformación de dicho índice, se tomaron ciertos parámetros característicos del tipo de contaminación que se presupone en la zona o lugar considerado, se los valorizó a través de un peso asignado a cada uno de ellos, y luego fueron reunidos a través de una formulación adecuada.

Se tomó como modelo el Índice de Calidad de Agua (ICA) desarrollado por la Fundación de Sanidad Nacional (NSF) de los Estados Unidos en el año 1970. Dicho índice es de carácter general y sus objetivos principales incluyen la estimación de calidad del agua tanto para protección de vida acuática como para actividades recreativas con contacto directo.

Los parámetros que intervinieron en el cálculo del ICA fueron los siguientes:

<i>Coliformes Fecales</i>
<i>pH</i>
<i>Demanda Bioquímica de Oxígeno (D.B.O.)</i>
<i>Nitratos</i>
<i>Fósforo Total</i>
<i>Temperatura</i>
<i>Turbidez</i>
<i>Sólidos Disueltos Totales</i>
<i>Oxígeno Disuelto</i>

La estructura básica del Índice se basa en la suma lineal ponderada de los diferentes subíndices, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$ICA_a = \sum_{i=1}^n (Sub_i * w_i)$$

Donde w_i corresponde a los pesos relativos asignados a cada parámetro (Sub_i) y ponderados entre 0 y 1, de tal forma que se cumpla que la sumatoria sea igual a uno. En este caso, Sub_i representa el subíndice del parámetro i .

La interpretación de los valores del ICA se basó en una serie de descriptores que, empleando referencias gráficas y de valores, permitieron encuadrar al valor obtenido del Índice de Calidad en: excelente, buena, media, mala o muy mala.

Tanto los parámetros fisicoquímicos determinados en las muestras de agua como el cálculo de los ICA respectivos, fueron realizados por el Programa de Efluentes Industriales y Urbanos de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones.

Adicionalmente, con el objeto de lograr una determinación más completa de la identidad de la muestra como un todo y estimar la presencia de compuestos orgánicos, las muestras de agua correspondientes a cada sitio fueron sometidas a un análisis cuantitativo de Cromatografía Gaseosa con detector de captura electrónica (GC-ECD) previa extracción en fase sólida (SPE).

Para ello, 500 ml de cada muestra de agua se filtraron mediante filtro de microcelulosa (0,45 μ m) y pasaron por una columna RP18 (Merk, 500 mg, 3 ml) previamente acondicionada con 10 ml de diclorometano, 10 ml de metanol y 10 ml de agua ultrapura. La muestra se pasó por la columna con un flujo de 10 ml/min dejando luego correr aire durante 10 min y nitrógeno por 10 min más. Los analitos retenidos se eluyeron con 5 ml de metanol y 5 ml de acetonitrilo (Bonansea *et al.*, 2013). El solvente se evaporó bajo corriente de nitrógeno y se redisolvió en 1 ml de hexano (Grado Plaguicida).

Los extractos obtenidos se analizaron por duplicado por un GC Agilent 6890 equipado con un detector de captura microelectrónica (ECD) y una columna capilar Agilent HP1 de 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m para separar los compuestos orgánicos (Maggioni *et al.*, 2012). Esta columna no polar se utiliza para el análisis de aminas, hidrocarburos, PCBs, pesticidas, fenoles y compuestos sulfurados. Cada pico

cromatográfico se multiplicó por un factor de 1×10^{-4} para trabajar con valores más simples de unidades arbitrarias (u.a.) (Merlo *et al.*, 2011).

Las determinaciones y cuantificaciones de los compuestos orgánicos presentes en las muestras de agua, fueron gentilmente realizadas en el Centro de Investigación en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

III ENSAYOS *IN VIVO*

III.1.- Material Biológico:

Las especies seleccionadas como bioindicadoras de contaminación para los ensayos *in vivo* fueron las siguientes:

III.1.1.- *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) o “almeja asiática”:

Un total de 145 organismos de esta especie fueron empleados durante el estudio. Los mismos fueron colectados manualmente, en primera instancia, sobre la ribera del Río Paraná a la altura de los balnearios denominados “Eriday y Gauchito Gil” y en la Reserva Natural Rincón de Santa María, próximos a la ciudad de Ituzaingó, al norte de la provincia de Corrientes.

Posteriormente, a fines del año 2009, como consecuencia del incremento en los niveles (cota) del Río Paraná en relación con el llenado del embalse de la represa hidroeléctrica Yacyretá, estos sitios fueron modificados considerablemente desapareciendo prácticamente todas las zonas balnearias. Desde entonces, los ejemplares necesarios para llevar a cabo los ensayos fueron colectados en los arroyos Cuñá-Pirú (localidad de Aristóbulo del Valle) y Piray Miní (ciudad de Eldorado), ambos afluentes directos del Río Paraná en la provincia de Misiones.

III.1.2.- *Limnoperla fortunei* (Dunker, 1857) o “mejillón dorado”:

Los especímenes de esta especie fueron colectados manualmente sobre la ribera del Río Paraná en la zona de la Reserva Natural Rincón de Santa María y en parte de las instalaciones de la represa hidroeléctrica Yacyretá (ciudad de Ituzaingó, provincia de Corrientes); como así también a la altura del municipio de Candelaria, situada al sur de la provincia de Misiones. Un total de 158 ejemplares fueron destinados a los bioensayos de exposición durante todo el periodo de estudio.

III.1.3.- *Steindachnerina brevipinna* (Eigenmann & Eigenmann, 1889) o “sabalito”:

Las capturas de estos peces nativos fueron realizadas en el Río Paraná a la altura de los municipios de Candelaria (El Anselmo); Corpus (Puerto Mani); San Ignacio (camping Yabebiry, próximo a la desembocadura del arroyo homónimo en el Río Paraná) y a la altura de la ciudad de Posadas (balneario “El Brete” y club Pira Pytá), provincia de Misiones.

Como artes de pesca empleadas en las capturas se utilizaron redes de arrastre y de espera con tamaños de malla de 4, 5 y 6 cm. En todos los casos, utilizando este tipo de redes que causan daños mínimos en el proceso de captura y seguido del rápido traslado de los ejemplares al laboratorio, se intentó mitigar la ocurrencia de lesiones e infecciones en los peces que entorpecieran los ensayos, garantizando así la supervivencia bajo condiciones apropiadas de los 132 organismos que fueron empleados durante el periodo de estudio en la realización de los ensayos.

III.2.- Diseño Experimental.

III.2.1.-Detoxificación de los ejemplares:

Una vez colectados, los ejemplares fueron trasladados al laboratorio donde permanecieron por un periodo de 15 a 20 días en acuarios de 100 cm de largo por 38 cm de alto y 28 cm de ancho, conteniendo agua declorinada constantemente aireada y bajo condiciones controladas de temperatura (25 ± 2 °C) para su aclimatación y detoxificación. Durante este periodo, los animales fueron alimentados dos a tres veces por semana con algas tipo espirulina en escamas y se efectuó un recambio semanal del 20 % del agua de los acuarios.

Transcurrido el tiempo de aclimatación y detoxificación, se procedió al desarrollo de los bioensayos de exposición propiamente dichos.

III.2.2.- Bioensayos de exposición y controles:

Grupos de entre 10 y 16 individuos, de acuerdo a la disponibilidad de cada una de las especies, fueron expuestos a los distintos tratamientos (aguas de río de los diferentes sitios de muestreo). Se seleccionaron individuos adultos de mayor longitud total y los mismos se agruparon en cada bioensayo de exposición de acuerdo a similitud de tamaño.

De esta manera, se evitaron diferencias etarias marcadas dentro y entre los tratamientos y controles respectivos, que pudieran interferir con los resultados posteriores.

Se llevaron a cabo ensayos estáticos de exposición a corto y mediano plazo para evaluar posibles efectos agudos y sub-crónicos. Para ello, los organismos fueron separados conformando dos grupos de 5 a 8 individuos cada uno y expuestos durante 3 y 10 días respectivamente a cada uno de los tratamientos, manteniendo las condiciones de aireación constante y temperatura controlada (25 ± 2 °C) en acuarios iguales de 54 cm de largo por 29 cm de ancho y 35 cm de alto.

Durante el periodo de exposición, los individuos fueron alimentados una única vez al séptimo día para evitar interferencias en los resultados del estudio debidas al incremento en los valores de nitratos como consecuencia de la descomposición del alimento y los desechos.

Simultáneamente, se llevaron a cabo los controles negativo y positivo.

Para el control negativo se utilizaron un total de 16 ejemplares de la especie *C. fluminea* y 10 ejemplares tanto de *L. fortunei* como de *S. brevipinna*. Siguiendo con la misma metodología, dos grupos conformados por un número igual de individuos (8 en el primer caso y 5 en los dos restantes) cada uno, fueron mantenidos por 3 y 10 días respectivamente en acuarios bajo las mismas condiciones de detoxificación.

En el caso del control positivo, 6 ejemplares de cada una de las especies tanto de moluscos como de peces, fueron expuestos durante 48 hs. a una concentración final de 15 mg/L de la droga Etilmetanosulfonato (EMS).

El EMS es un agente alquilante de acción directa sobre el ADN cuyos efectos mutagénicos han sido ampliamente demostrados y por ello es muy utilizado como control positivo en ensayos de genotoxicidad (Hooftman y de Raat, 1982; Dopp *et al.*, 1996).

Paralelamente, se llevó a cabo un ensayo que permitiera evaluar los efectos generados en los organismos debido a la manipulación y el estrés frente a repetidas extracciones del material biológico. Este análisis se realizó principalmente en peces y ocasionalmente en los bivalvos, ya que el pequeño tamaño de estos últimos implicó en la mayoría de los casos el sacrificio de los ejemplares durante la obtención de las muestras necesarias para el desarrollo de los ensayos de genotoxicidad.

En este sentido, en los casos en que se contó con un número suficiente de organismos, aquellos que sobrevivieron a la primera extracción de sangre y/o hemolinfa al tercer día de exposición a los tratamientos y controles respectivos, continuaron con los ensayos y fueron evaluados de la misma manera al cumplirse el décimo día de exposición.

III.2.3.- Obtención de las muestras biológicas:

Una vez finalizados los periodos de exposición a los distintos tratamientos y controles, se procedió a la toma de muestras del material biológico necesario para llevar a cabo los ensayos de genotoxicidad en las tres especies escogidas como bioindicadoras:

***Corbicula fluminea* y *Limnoperna fortunei*:** Se extrajeron aproximadamente 0,1 – 0,3 ml de hemolinfa a partir del músculo aductor posterior de las conchillas de los bivalvos de ambos grupos, mediante el empleo de jeringas tipo tuberculina de 1 ml.

Parte de las muestras de hemolinfa así obtenidas fueron destinadas al test de Micronúcelos; en tanto el material restante de las muestras fue centrifugado a 2000 rpm durante 5 min y luego de descartar el sobrenadante, se trabajó con el pellet resultante para la aplicación del Ensayo Cometa.

Por otra parte, se tomaron las medidas de longitud total de las valvas de cada individuo considerando la distancia entre los bordes anterior y posterior. Para ello, se utilizó un calibre de medición tipo Vernier de 0 – 150 mm x 0,05 mm.

***Steindachnerina brevipinna*:** A partir de la vena caudal de los peces, se extrajeron 0,1 a 0,2 ml de sangre periférica mediante el uso de jeringas tipo tuberculina de 1 ml previamente heparinizadas, para evitar la coagulación de las muestras. Para ello, debió realizarse una punción de los ejemplares en posición ventral, a la altura de la terminación de las aletas anales.

De las muestras de sangre obtenidas, una a dos gotas fueron utilizadas en el test de Micronúcleos, mientras que 10 µl de la sangre total restante fue diluida en 1000 µl de solución de buffer fosfato (PBS), para ser empleada en el Ensayo Cometa.

Se tomaron las medidas estándar de longitud total de cada uno de los individuos analizados, entendida como la distancia entre la boca y el inicio de la aleta caudal mediante un calibre de medición tipo Vernier de 0 – 150 mm x 0,05 mm.

III.3.- Ensayo de recuperación de daños:

Una vez finalizados los periodos de exposición de los ejemplares de las especies *Corbicula fluminea*, *Limnoperna fortunei* y *Steindachnerina brevipinna* a las respectivas muestras de agua colectadas en los cuatro sitios de muestreo sobre el Río Paraná durante el año 2011, 10 ejemplares de cada una de estas especies fueron trasladados a acuarios

conteniendo agua declorinada constantemente aireada y bajo temperatura controlada ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), manteniendo las características empleadas en la detoxificación.

Este procedimiento se llevó a cabo únicamente para aquellos sitios de muestreo que manifestaron causar daños más importantes en el material genético de los indicadores biológicos, es decir para Puerto Piray y Puerto Mineral. Además, debido al tipo de efluentes que se encontraron presentes en dichas muestras de agua, próximas al sitio de descarga de industrias papeleras con irregularidades en los tratamientos de sus residuos de producción, resultaron los puntos de muestreo más relevantes para este tipo de ensayos.

En los días 5, 10 y 15 posteriores a la exposición bajo estas condiciones, se procedió a la toma de muestras de hemolinfa en los bivalvos y de sangre en los peces tal como se detalló anteriormente, para ser luego evaluadas mediante los Ensayos Cometa, de Micronúcleos y Alteraciones de la Morfología Nuclear. Debido a la fragilidad de los bivalvos y la disponibilidad de los peces, cuya captura resultó dificultosa para este periodo debido a las modificaciones en las condiciones del río, el ensayo correspondiente a los 15 días de recuperación sólo fue posible para la especie *S. brevipinna* luego de los bioensayos con aguas de Pto. Mineral.

La reducción del porcentaje de Micronúcleos y Alteraciones de la Morfología Nuclear posteriores al ensayo de recuperación fue calculada de acuerdo con Waters *et al.* (1990), y Menoli *et al.* (2001) con modificaciones, según la adaptación de la siguiente fórmula:

$$\text{Reducción (\%)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células con MN en A} - \text{N}^{\circ} \text{ de células con MN en B}}{\text{N}^{\circ} \text{ de células con MN en A} - \text{N}^{\circ} \text{ de células con MN en C}}$$

Donde A corresponde al grupo de células provenientes de individuos expuestos a los tratamientos que causaron mayor nivel de daño al ADN; B al grupo de células obtenidas a partir de individuos que luego de ser expuestos a los tratamientos, fueron detoxificados para su recuperación y C al grupo de células provenientes de individuos del control negativo.

Finalmente, para evaluar la reversión de los daños provocados por los tratamientos respectivos sobre el ADN, se aplicaron los análisis estadísticos mencionados al finalizar el apartado, de acuerdo con la técnica correspondiente.

IV ENSAYOS *IN VITRO*

IV.1.- Material biológico:

Para la realización de los ensayos *in vitro*, se trabajó con cultivo de células de ovario de hámster chino de línea salvaje (CHO-K1).

Las células CHO-K1 fueron obtenidas a partir de la línea que se mantiene en el laboratorio de Genética Toxicológica del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Estadual de Londrina (Estado de Paraná, Brasil) a cargo del Dr. Mário Sérgio Mantovani.

Las mismas fueron extraídas de ampollas almacenadas en nitrógeno líquido y descongeladas en forma directa a 37 °C.

IV.2.- Diseño experimental:

IV.2.1.-Condiciones para el cultivo celular:

Las células fueron cultivadas en frascos de cultivo de 25 cm² en forma de monocapa (cultivo de adherencia), en medio de cultivo HAM F12 + D-Mem (1:1), suplementado con 10 % de suero bovino fetal, 0,1 % de solución antibiótica-antimicótica y tamponado con 1,2 g de bicarbonato de sodio para ajustar el pH a 7,2. El cultivo se condujo a 37 °C en estufa de cultivo tipo DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno).

Partiendo de las células recién descongeladas, se sembraron 3 a 4 frascos de cultivo durante 48 – 72 h, hasta lograr un crecimiento adecuado de las células sobre toda la superficie de contacto. Con este procedimiento, se obtuvo una concentración celular suficiente para desarrollar los tratamientos de exposición a las muestras de agua correspondientes a los cuatro sitios de muestreo sobre el Río Paraná y los respectivos controles negativo y positivo.

IV.2.2.- Pretratamiento y estabilización celular:

Finalizado el periodo de crecimiento celular durante 48 – 72 h, se procedió al montaje de los frascos destinados al pre tratamiento y estabilización de las células. Para ello, se siguieron los pasos detallados a continuación:

a) Descarte del medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal de los frascos respectivos.

b) Lavado de los frascos de cultivo con 5 ml de PBS. Este paso se repitió dos veces, descartando el PBS luego de cada lavado.

c) Tripsinización de los frascos con 0,5 ml de tripsina durante 4 a 5 min para el desprendimiento de las células.

d) Inactivación de la tripsina mediante el agregado de 1,5 ml de medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal y homogeneización de las células.

e) Montaje de los frascos necesarios para los pretratamientos. Para ello, partiendo de la suspensión celular obtenida del paso anterior, se tomó una gota y se estableció la media celular contabilizando 4 campos en cámara de Neubauer a través de un microscopio invertido. Finalmente, se calculó la cantidad de suspensión necesaria para alcanzar una concentración celular de $0,5 \times 10^6$ en cada frasco de cultivo.

f) Luego de sembrar las células en los frascos destinados a los pretratamientos, los mismos fueron llevados a estufa a 37 °C durante aproximadamente 12 h, tiempo necesario para lograr la estabilización celular previa al tratamiento propiamente dicho.

IV.2.3.- Tratamientos y controles:

Para la evaluación *in vitro* del efecto de las muestras de agua de río y controles, se realizaron tratamientos directos en cultivo de células de la línea CHO-K1.

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, de manera que se procedió al montaje de un total de 18 frascos de cultivo por cada lote de muestras de agua correspondientes a los cuatro sitios sobre el Río Paraná y los respectivos controles negativo y positivo.

Una vez finalizado el tiempo de estabilización celular, los 18 frascos previamente sembrados con $0,5 \times 10^6$ células en los pretratamientos, fueron destinados al siguiente procedimiento:

Tratamientos con agua de río: los tratamientos directos se realizaron empleando medio de cultivo HAM - F12 concentrado al 25 %, que fue diluido en proporción 3:1 con el agua de las muestras tomadas del Río Paraná previamente filtradas. En los casos necesarios, debió ajustarse el pH de la dilución final a 7, evitando así alterar las condiciones del medio de cultivo apropiadas para el crecimiento celular.

Controles experimentales: los controles negativos se realizaron exponiendo las células a una solución de PBS en medio de cultivo concentrado en proporción 3:1; en tanto para el control positivo las células fueron expuestas a una concentración 4 mM de Metilmetanosulfonato (MMS) en solución final para el ensayo cometa y de 0,4 mM para el test de Micronúcleos y Alteraciones de la Morfología Nuclear.

El MMS, al igual que el EMS empleado como control positivo en los ensayos *in vivo*, es un agente alquilante de acción directa muy utilizado como inductor de daños en el

ADN, debido a su capacidad de generar sitios apurínicos que pueden resultar en rupturas de la hebra del material genético durante el proceso de reparación celular (Mitchelmore y Chipman, 1998; Menoli *et al.*, 2001; Fedato *et al.*, 2010; Speit y Rothfuss, 2012).

Los tiempos de exposición de las células tanto en los tratamientos como en los controles para el Ensayo Cometa, se basaron en los trabajos de Bellini *et al.* (2006) y Caffetti *et al.* (2008). Los mismos fueron de 2 h (37 °C), ya que la interacción directa de las muestras de interés con las células en cultivo requiere de tiempos de exposición cortos para poner de manifiesto daños de carácter genotóxico. Por otra parte, para el test de Micronúcleos y Alteraciones de la Morfología Nuclear, los tiempos de exposición fueron de aproximadamente 12 a 15 h (37 °C), periodo necesario para completar un ciclo celular y poner de manifiesto los micronúcleos. Estos tiempos fueron adoptados siguiendo las recomendaciones de Lorge *et al.* (2006) y OECD (2010), donde se establecen las guías para el Test de Micronúcleos *in vitro* en células de mamíferos. De acuerdo con dichos trabajos, la exposición prolongada de al menos un ciclo celular sin periodo posterior de recuperación de las líneas celulares a los tratamientos, es uno de los protocolos recomendados para la aplicación del Test de Micronúcleos sin incorporación de citocalasina B (agente causante del bloqueo de la citocinesis), en especial cuando se trabaja con muestras de naturaleza compleja como las analizadas en este estudio, ya que luego de tratamientos prolongados son detectados ciertos químicos capaces de afectar al huso mitótico o actuar como análogos de base.

Una vez finalizadas las horas de tratamiento y controles respectivamente, se procedió a efectuar la cosecha celular de la siguiente manera:

Descarte de las soluciones tratamiento en tubos de centrífuga.

Lavado de los frascos de cultivo con 5 ml de PBS a temperatura ambiente. Este paso se repitió dos veces, descartando el PBS luego de cada lavado.

Tripsinización de los frascos con 0,5 ml de tripsina durante 4 min en estufa a 37 °C para el desprendimiento de las células.

Inactivación de la tripsina adicionando las mismas soluciones tratamiento reservadas en los tubos de centrífuga.

Para el caso de los tratamientos destinados al test de Micronúcleos, se agregó una gota de formaldehído (40 %) a la solución final de cada tubo.

Por último, se homogeneizaron suavemente las suspensiones celulares obtenidas y se centrifugaron a 1250 rpm durante 5 min.

A partir de estas suspensiones celulares finales, se continuó con los protocolos del Ensayo Cometa, Test de Micronúcleos y Alteraciones de la Morfología Nuclear, respectivamente.

V PROTOCOLO DEL ENSAYO COMETA

Partiendo de las suspensiones celulares obtenidas luego de los tratamientos, tanto *in vivo* como *in vitro*, una alícuota de 20 µl de cada una de ellas se homogeneizó con 120 µl de agarosa de bajo punto de fusión (LPM) al 0,5 %. Esta nueva suspensión celular se depositó delicadamente sobre portaobjetos cubiertos con agarosa de punto de fusión normal (NMP) al 1,5 % previamente solidificada. A continuación, se colocaron los cubreobjetos correspondientes y los preparados fueron llevados a heladera (4 °C) durante 20 min hasta lograr la solidificación de las muestras. Al cabo de este tiempo, los portaobjetos fueron retirados de la heladera y con la posterior remoción de los cubreobjetos, las preparaciones estuvieron listas para continuar con el protocolo del Ensayo Cometa.

El procedimiento general del ensayo fue conducido de acuerdo a la técnica descrita por Speit y Hartmann (1999). Dicho protocolo está basado en el trabajo original de Singh *et al.* (1988) con algunas modificaciones, conforme a los pasos que se describen a continuación:

1) Lisis del material: se llevó a cabo sumergiendo las células en una solución de lisis fría (4 °C) conteniendo 1 ml de Tritón X-100, 10 ml DMSO y 89 ml de solución de lisis stock (NaCl 2,5 M; EDTA 100 mM ; Tris 10 mM y Laurilsarcosinato de sodio 1% ajustado a pH 10,0) protegida de la luz.

2) Desnaturalización: El ADN de las células fue desnaturalizado por exposición a un tampón de electroforesis enfriado a 4 °C (24 ml NaOH 10 N, 4 ml EDTA, 800 ml de agua deionizada) bajo condiciones alcalinas (pH > 13) durante 20 min.

3) Electroforesis: La corrida electroforética fue conducida durante 20 min a 4 °C y manteniendo las condiciones alcalinas (tampón de electroforesis pH > 13), a 25 V y 300 mA. En cada corrida electroforética, portaobjetos correspondientes a distintos tratamientos fueron distribuidos al azar hasta cubrir toda la superficie de la cuba y bajo las mismas condiciones durante todo el ensayo.

4) Neutralización: Se efectuaron 3 lavados de 5 min cada uno con un tampón de neutralización (Tris 0,4 M en agua deionizada a pH 7,5).

5) Fijación: Los portaobjetos conteniendo el material ya neutralizado se fijaron en etanol absoluto durante 10 min y posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente.

6) Coloración, observación y análisis: El material fue coloreado con bromuro de etidio en el momento del análisis, que se llevó a cabo en forma visual por medio de un microscopio de epifluorescencia con una magnificación de 400 X de aumento, filtro de excitación de 420-490 nm y filtro de barrera de 520 nm. Se analizaron 100 células (nucleoides) por cada individuo en los ensayos *in vivo*; en tanto se contabilizaron 300 nucleoides por tratamiento para los ensayos *in vitro*. Considerando que en este último caso los tratamientos se hicieron por triplicado, el análisis incluyó 100 células/tratamiento/repetición.

Las células fueron clasificadas de acuerdo al daño genético en cuatro categorías o clases diferentes en función del largo del cometa, tomando en cuenta el tamaño e intensidad de la cola de los mismos:

Clase 0: sin cola (sin daño).

Clase 1: con cola pequeña menor al diámetro de la cabeza (daño mínimo).

Clase 2: con una longitud de cola entre 1 y 2 veces el diámetro de la cabeza (daño moderado).

Clase 3: con cola superior a 2 veces el diámetro de la cabeza (daño intenso).

Clase 4: casi todo el ADN formando parte de la cola del cometa, es decir, células totalmente dañadas (daño máximo).

Para cada tratamiento se calculó el índice de daño (ID) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$ID = (0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D) + (4 \times E)$$

Donde 0, 1, 2, 3 y 4 corresponden a las distintas clases de cometas y A, B, C, D y E al número de nucleoides que presentan la clase correspondiente de daño.

Este método permite la cuantificación de la migración y el análisis de distribución de daños.

Un solo observador evaluó toda la experiencia y el análisis fue realizado a ciegas mediante la codificación de los vidrios, tanto los correspondientes a los tratamientos como a los controles.

Todos los pasos de la técnica (desde la obtención de las suspensiones celulares hasta la conclusión del ensayo cometa) se realizaron protegidos de luz directa para evitar daños adicionales sobre el ADN, no relacionados con los tratamientos respectivos.

Ensayo de viabilidad celular: dado que el ensayo cometa es utilizado para la detección de daños de tipo genotóxicos, es necesario evaluar la citotoxicidad de las muestras.

Para ello, se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante coloración por exclusión con el colorante vital azul de tripán.

Este ensayo se basa en la capacidad de las células viables de ser impermeables al colorante azul de tripán. Cuando la integridad de las membranas celulares se encuentra comprometida, las células pierden esta capacidad incorporando al colorante en su interior. Por lo tanto, las células viables aparecen como incoloras al ser observadas al microscopio, en tanto que aquellas células consideradas inviables o comprometidas, se visualizan de color azul.

La técnica consistió en tomar 10 µl de las distintas suspensiones celulares previamente obtenidas y homogeneizarlas con 10 µl del colorante azul de tripán. De esta manera, se sembraron 20 µl de la nueva suspensión en cámara de Neubauer y se contabilizaron 100 células por preparado al microscopio óptico bajo un aumento de 1000 X.

Se consideró una viabilidad celular superior al 90% por cada preparado analizado para poder ser incluido en la aplicación del ensayo cometa.

El porcentaje de viabilidad celular fue calculado de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad Celular} = \frac{\text{N}^\circ \text{ células viables}}{\text{Total células contadas}} \times 100$$

VI PROTOCOLO DEL TEST DE MICRONÚCLEOS Y ALTERACIONES DE LA MORFOLOGÍA NUCLEAR

Las características fisiológicas particulares, tanto de los biomarcadores como de los distintos indicadores biológicos empleados en este estudio, hizo necesaria la adecuación de

los protocolos del test de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) a cada modelo.

VI.1.-Ensayos *in vivo*:

VI.1.1.-*Corbicula fluminea* y *Limnoperna fortunei*:

La hemolinfa, tejido utilizado en la aplicación del test de MN y AMN en los bivalvos de estas especies, tiene la particularidad de presentar dos tipos celulares (hemocitos nucleados) diferentes: granulocitos y hialinocitos.

Por ello, debieron identificarse y caracterizarse adecuadamente ambos tipos celulares para ser incluidos de manera independiente en el análisis.

La técnica de MN y AMN desarrollada para estas especies de moluscos bivalvos se describe a continuación:

a) Partiendo de la hemolinfa obtenida a partir del músculo posterior aductor, aproximadamente 150 µl se utilizaron para la obtención de un delicado extendido del material sobre portaobjetos.

b) Los extendidos se dejaron secar completamente a temperatura ambiente.

c) Una vez secas, las preparaciones fueron fijadas en metanol absoluto durante 10 min.

d) Finalmente, fueron teñidas con Giemsa diluido al 5 % en agua deionizada durante 5 min.

e) El análisis se realizó estimando la frecuencia de MN y AMN en un total de 500 a 1000 hemocitos nucleados por ejemplar, dependiendo en cada caso de la disponibilidad de material para el conteo.

Teniendo en cuenta la presencia de dos tipos diferentes de hemocitos nucleados en los extendidos, las frecuencias de MN y AMN se calcularon de manera independiente para los hialinocitos (hemocitos agranulares) y para los granulocitos (hemocitos granulares) por individuo, así como para los grupos de tratamientos y controles.

Se estimó además la frecuencia de hialinocitos binucleados (HB) y trinucleados (HT) por individuo y por grupos de tratamientos y controles de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia HB/HT} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de hialinocitos binucleados/trinucleados}}{\text{Total de hialinocitos contados}}$$

Por otra parte, con el propósito de evaluar la citotoxicidad de las muestras, se contabilizaron aquellas células que presentaron núcleos fragmentados (presumiblemente apoptóticas). Si bien estas células no fueron incluidas en el análisis de frecuencias de MN y AMN, la estimación del porcentaje de células con núcleos fragmentados (que debió ser inferior al 20%), fue utilizada para inferir el grado de daño causado por los tratamientos y la inclusión de los preparados a los ensayos genotóxicos.

Todos los análisis mencionados se realizaron en microscopio óptico de luz blanca bajo inmersión, con un aumento de 1000X.

VI.1.2.- *Steindachnerina brevipinna*:

La técnica de MN y AMN aplicada para el modelo de los peces, fue desarrollada según Barsiene *et al.* (2006) tal como se describe a continuación:

Sobre portaobjetos limpios y desengrasados, se realizaron delgados frotis sanguíneos con la ayuda de un segundo portaobjeto inclinado a 45°, que se deslizó suavemente a partir de 1 ó 2 gotas de la sangre periférica obtenida mediante punción de la vena caudal de los peces.

Los extendidos se dejaron secar completamente a temperatura ambiente.

Una vez secas, las preparaciones fueron fijadas en metanol absoluto durante 15 min.

Finalmente, fueron teñidas con Giemsa al 10% en agua deionizada durante 10 min.

Todos los frotis se realizaron por duplicado y se analizaron un total de 2000 eritrocitos nucleados por ejemplar, contabilizando 1000 eritrocitos por cada portaobjetos duplicado. Los análisis se llevaron a cabo en microscopio óptico de luz blanca bajo inmersión, con un aumento de 1000 X.

Se calculó la frecuencia de MN y AMN por individuo y por grupos de tratamientos y controles.

Independientemente, se registraron aquellas células que mostraron núcleos fragmentados y/o vacuolados, posibles indicadores de eventos apoptóticos y/o necróticos respectivamente. Este registro permitió analizar la citotoxicidad de las muestras, donde valores inferiores al 20% fueron consideradas aptas para su inclusión al test de MN y AMN.

VI.2.- Ensayos *in vitro*:

VI.2.1.- Cultivo de células CHO-K1:

A partir del material obtenido por centrifugación luego de la exposición a los tratamientos y controles tal como se describe en el apartado referido al diseño experimental de los ensayos *in vitro*, se descartó el sobrenadante obtenido dejando una suspensión final de aproximadamente 1,5 ml.

El procedimiento empleado para la fijación de las suspensiones celulares, los preparados de los portaobjetos y la coloración final se basó en Menoli *et al.* (2001):

Se adicionaron sobre las paredes de los tubos 1,5 ml de citrato de sodio (1 %) frío.

Se homogeneizó suavemente la suspensión celular, para luego ser centrifugada a 1250 rpm durante 5 min.

El sobrenadante fue descartado y se resuspendió el sedimento (pellet) obtenido. Se adicionaron 5 ml de fijador farmer (metanol / ácido acético 3:1), homogeneizando rápidamente.

La nueva suspensión fue nuevamente centrifugada a 1250 rpm durante 5 min.

Una vez centrifugada la suspensión, se quitó el sobrenadante obtenido dejando una cantidad aproximada de 0,5 ml y adicionando fijador fresco hasta alcanzar la dilución deseada dependiendo de la cantidad de material.

Las células así fijadas fueron goteadas sobre portaobjetos previamente enfriados a 4 °C, limpios y desengrasados, dejando una película de agua enfriada a 4 °C sobre la superficie de los mismos.

Los preparados se dejaron secar completamente a temperatura ambiente.

Finalmente, fueron coloreados durante 5 min con Giemsa al 5 % en tampón fosfato Sörensen (5,26 g KH_2PO_4 y 8,65 g Na_2HPO_4 en 1000 ml de agua deionizada).

Teniendo en cuenta que los tratamientos y controles se realizaron por triplicado, se contabilizaron un total de 6000 células por tratamiento. Es decir: 2000 células/tratamiento/repetición. El análisis se llevó a cabo en microscopio óptico de luz blanca con aumento de 1000 X, bajo inmersión.

Se calcularon las frecuencias de MN y AMN cada 2000 células por repetición y por grupos de tratamientos y controles.

Adicionalmente, a modo de evaluar la citotoxicidad de los preparados, se contabilizaron las células en estado apoptótico y/o necrótico con núcleos y/o citoplasmas fragmentados y se calculó el índice mitótico (IM) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de metafases}}{\text{Total de células analizadas}}$$

VI.3.- Criterios para el recuento de Micronúcleos:

Los criterios utilizados para la determinación y el recuento de MN se basaron en los establecidos por Schmid (1976) y Fenech (2000), con algunas consideraciones relacionadas al tamaño y morfología de los micronúcleos en peces y moluscos de acuerdo con Al-Sabti y Metcalfe (1995) y Barsiene *et al.* (2006).

Fueron incluidas en el recuento únicamente aquellas células con membrana citoplásmica y nuclear intactas, sin superposición.

El criterio adoptado para la identificación y caracterización de los micronúcleos (MN) fue el siguiente:

a) Los MN deben ser cuerpos circulares u ovalados con las mismas características del núcleo principal pero más pequeños, adoptando un tamaño equivalente a 1/3 - 1/20 veces el diámetro del núcleo principal.

b) No deben presentar refringencia y por lo tanto, ser claramente diferenciados de artefactos productos de la coloración.

c) Deben estar visiblemente separados del núcleo principal de manera que la membrana que rodea al micronúcleo pueda distinguirse de la membrana nuclear.

d) La intensidad de coloración de los micronúcleos debe ser igual o levemente más sutil que la del núcleo principal.

VI.4.- Clasificación de las Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN):

Las células que mostraron variaciones respecto de la morfología circular u ovalada normalmente encontrada en los núcleos de eritrocitos maduros, hemocitos y células CHO-K1, fueron consideradas como Alteraciones de la Morfología Nuclear.

La clasificación y los criterios adoptados en la identificación de las AMN encontradas en las preparaciones celulares, se basaron en las descripciones realizadas por Carrasco *et al.* (1990) y Fenech (2000):

Núcleos globulares o “Blebbed”: núcleos con evaginaciones relativamente pequeñas de la membrana nuclear conteniendo eucromatina.

Núcleos lobulados o “Lobed”: núcleos con evaginaciones mayores que las observadas en los núcleos de tipo globulares, a modo de protuberancias de la membrana nuclear. Pueden ser simples o múltiples.

Núcleos con muescas o “Notched”: núcleos con hendiduras apreciables, adoptando una morfología de tipo arriñonada.

Núcleos con puentes cromatínicos o nucleoplásmicos: pueden presentarse como una extrusión del material nuclear en estructuras similares a los micronúcleos, pero que mantienen una conexión nucleoplásmica estrecha con el núcleo principal. En otras situaciones, pueden presentarse como un enlace continuo de cromatina entre los núcleos principales de una célula binucleada.

Núcleos con gemaciones o “Bud”: núcleos que presentan estructuras similares a vesículas o gemaciones que se mantienen ligeramente unidas al núcleo principal. Adicionalmente, otras Alteraciones de la Morfología Nuclear identificadas y que se incorporaron a la clasificación fueron:

Núcleos en forma de ocho o “Eightshaped”: tal como su nombre lo indica, son núcleos que muestran una constricción en la región media adoptando una forma de ocho característica.

Células binucleadas: fueron consideradas en esta categoría los eritrocitos de peces y los hemocitos granulares (granulocitos) de bivalvos que presentaron dos núcleos principales de idéntico tamaño o muy similares entre sí.

Las frecuencias totales de AMN se calcularon por individuo/preparado y por grupos de tratamientos y controles a partir del recuento y clasificación de las mismas dentro de la categoría correspondiente.

VII ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En principio, para probar la distribución normal de los datos, se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks. El supuesto de distribución normal, que constituye la

hipótesis de partida o hipótesis nula (H_0) se evaluó con un intervalo de confianza del 95%. Valores de $p < 0,05$ proporcionaron evidencia suficiente para rechazar el supuesto de distribución normal. El mismo criterio se utilizó en la aplicación de la prueba F para homogeneidad de varianzas.

Los datos obtenidos de los ensayos genotóxicos que presentaron distribución normal y varianzas homogéneas, fueron analizados estadísticamente a través del test paramétrico de análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher, para la evaluación entre los distintos tratamientos. Dichas pruebas fueron aplicadas en cada modelo biológico y para cada periodo de muestreo.

En cuanto a los resultados que no mostraron distribución normal, fueron comparados estadísticamente utilizando como modelo de análisis de la varianza no paramétrica, el test de Kruskal-Wallis por periodo de muestreo y modelo biológico.

Las mismas pruebas estadísticas fueron utilizadas para analizar los datos obtenidos en los ensayos de recuperación de daños durante 5, 10 y 15 días; así como en los análisis de efecto de manipulación y estrés de los organismos.

En este último caso, se establecieron comparaciones entre grupos de organismos sometidos a una única extracción de muestra biológica al décimo día de ensayo de exposición, y aquellos que fueron sometidos a repetidas extracciones tanto al tercer como décimo día de exposición a los tratamientos correspondientes. Como resultado de dicha comparación, en los casos en que los análisis no mostraron diferencias significativas, los individuos sujetos a estudios de estrés fueron incluidos dentro del tratamiento respectivo, incrementando así el tamaño de la muestra.

Los test estadísticos aplicados, al ser de comparaciones múltiples, se utilizaron con la finalidad de evaluar la potencial genotoxicidad de los sitios de muestreo, estimando incrementos significativos del daño causado al ADN respecto a los controles con un intervalo de confianza del 95 % y un $p < 0,05$.

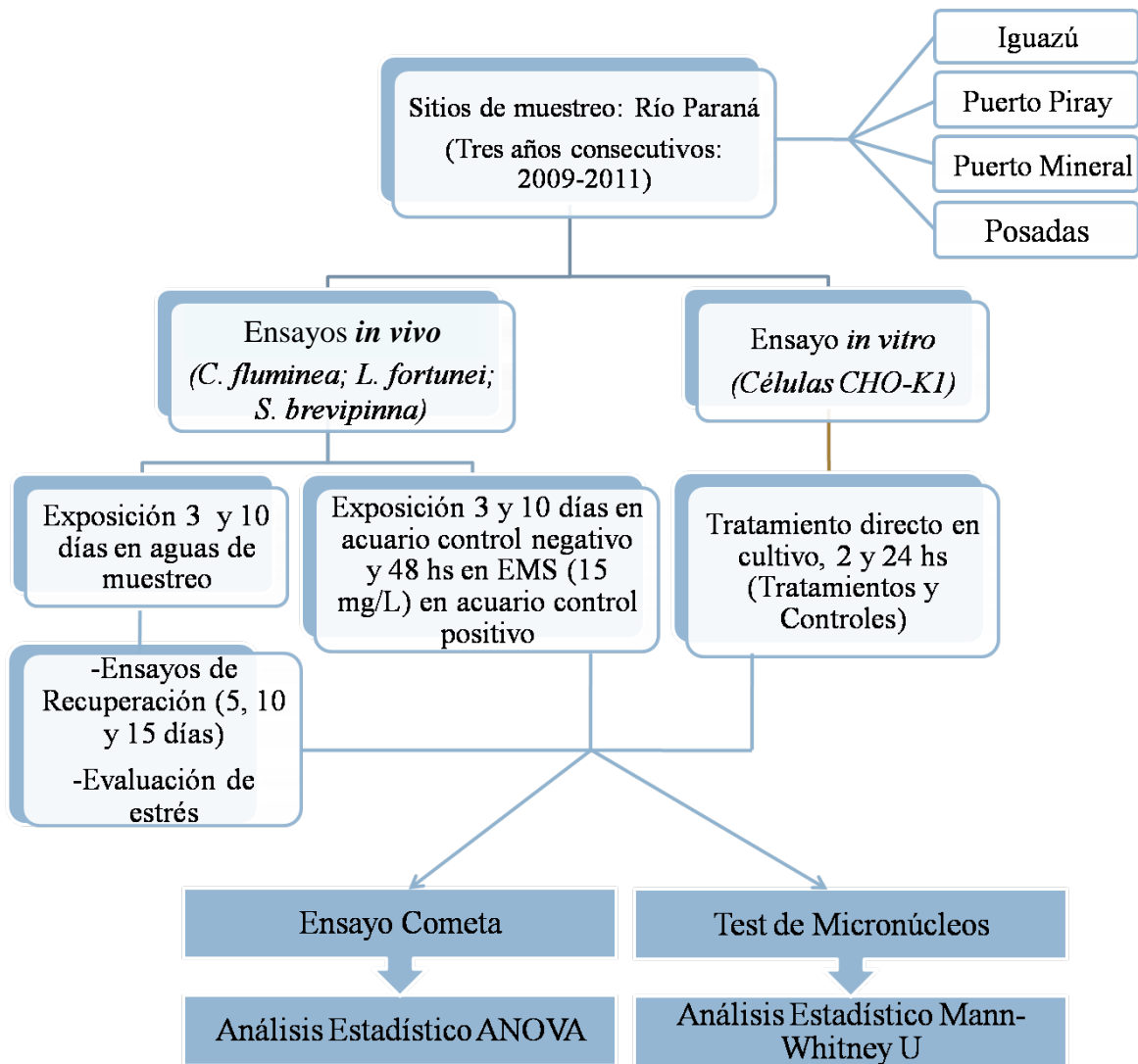
Con la intención de comparar la respuesta de los distintos modelos biológicos a los respectivos tratamientos, bien como establecer un análisis global para cada sitio de muestreo seleccionado, se aplicaron los análisis estadísticos para los ensayos Cometa, MN y AMN *in vivo* e *in vitro*, a los fines de comparar los datos totales obtenidos por cada sitio de muestreo durante el periodo de estudio completo (2009-2011) respecto a los controles.

Finalmente, se realizó un análisis de correlación de datos entre los valores del ICA en cada sitio y los índices totales de daño en el ADN por tratamiento. Esta correlación se estableció de manera independiente para los ensayos cometa y de MN, con el propósito de

establecer una comparación en cuanto a la eficiencia y sensibilidad de ambas técnicas en la detección de los daños en el ADN en función de las variaciones en la calidad de las aguas. La prueba utilizada a tales fines, fue el análisis de sendero (*path analysis*).

Para la aplicación de las pruebas estadísticas mencionadas, se utilizó el programa InfoStat/E versión 2012 (Di Rienzo *et al.*, 2012).

A continuación, se presenta un resumen esquemático del apartado correspondiente a Materiales y Métodos:



RESULTADOS



SECCIÓN I

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

La variación del nivel (altura) y las fluctuaciones del caudal del Río Paraná en las zonas correspondientes a los sitios de muestreo durante los años 2009, 2010 y 2011, se presentan en la figura 2.

Los niveles descendentes del río desde el sitio ubicado en el extremo norte (Iguazú) hacia la zona sur de la provincia (Posadas), reflejan la pendiente propia de la cuenca hidrográfica en este tramo del Alto Paraná. Se observó un aumento de entre 4 y 5 metros en la altura del río a partir del mes de septiembre del año 2009 para el trayecto comprendido entre Iguazú y Pto. Mineral, que se mantuvo durante todo el año 2010. En el último año 2011, se registró un nuevo descenso en el nivel del río a partir del mes de enero, que osciló entre 10 metros a la altura de Iguazú y 2,63 metros en Pto. Mineral.

Es posible apreciar que en Posadas, a diferencia de los sitios restantes, el nivel del río presentó una tendencia ascendente uniforme hasta el final del estudio. Cabe destacar que este tramo comprende la zona de embalse de la represa hidroeléctrica de la Entidad Binacional Yacyretá (EBY), ubicada a pocos kilómetros en la ciudad de Ituzaingó (Corrientes). Por lo tanto, el comportamiento diferencial observado a la altura de Posadas, coincide con lo proyectado por la EBY en relación con el aumento secuencial de la cota del Río Paraná. A partir del año 2009, comenzó el aumento a cota 78 (m.s.n.m), para ascender a cota 80 y 84 durante los años 2010 y 2011 respectivamente. Durante este último año, los niveles del río en Posadas se solaparon e incluso superaron los alcanzados a la altura de Pto. Mineral, sitio ubicado aproximadamente 140 km aguas arriba siguiendo la progresiva del río.

De acuerdo con el registro obtenido durante los tres años consecutivos, el caudal promedio del Río Paraná fue de 16.097 m³/s (figura 2). Si se consideran los caudales anuales, los valores más elevados se presentaron durante el 2010, con un caudal promedio de 16.762 m³/s. Durante el año 2011, el caudal promedio fue de 16.434 m³/s y de 15.096 m³/s en el año 2009. Estos registros anuales se correlacionan, en términos generales, con las variaciones encontradas en los niveles del Río Paraná en los diferentes tramos objeto de estudio.

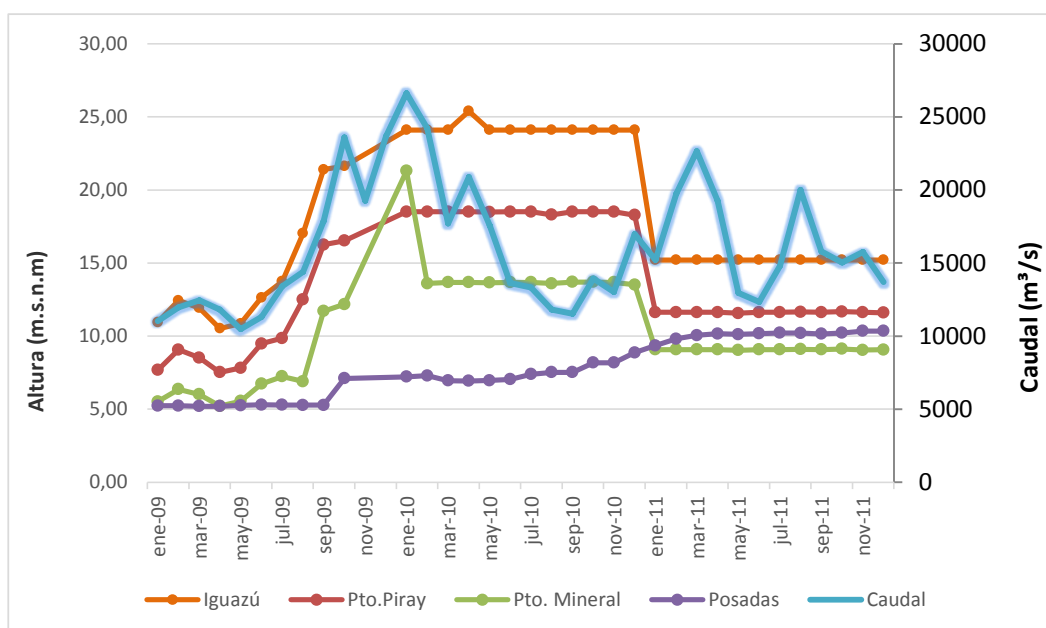


Figura 2. Variación de los niveles (altura expresada en metros –m–) y caudales (m^3/s) del Río Paraná en los diferentes sitios de muestreo durante los años 2009, 2010 y 2011.

El pico de caudal más importante durante el año 2009 se presentó en el mes de octubre, alcanzando un total de $23.603 m^3/seg$. Durante el mes de marzo del 2010, se alcanzó el pico de caudal más elevado de toda la serie, con un valor de $26.617 m^3/seg$; mientras que en el año 2011 dicho registro se obtuvo durante el mes de mayo, con $22.659 m^3/seg$.

Debido a que las variaciones en los niveles y el caudal del Río Paraná dependen principalmente de las precipitaciones que afectan su cuenca, los picos de caudales se vieron reflejados por las crecientes ocurridas en los meses correspondientes. En concordancia con el clima subtropical sin estación seca de la provincia de Misiones, se pudo apreciar que no existieron diferencias estacionales que marcaran diferencias en este sentido.

A partir de las mediciones de los diferentes parámetros fisicoquímicos analizados en cada muestra de agua obtenida a lo largo del Río Paraná en la Provincia de Misiones, a saber: Iguazú, Puerto Piray, Puerto Mineral y Posadas, se estimaron los valores medios de dichos parámetros para cada año de estudio, es decir, para los años 2009, 2010 y 2011 (tablas I, II y III).

Sólo algunos valores excedieron los niveles guía de calidad de agua en función de los diferentes usos del recurso, de acuerdo a la normativa vigente según la Secretaría de

Recursos Hídricos Cuenca del Plata (ver Anexo I). Estos valores se encontraron fuera del límite principalmente para uso humano del agua con tratamiento convencional y para protección de vida acuática. El caso excepcional fue el pH, cuyos valores excedieron los niveles guía para todos los usos recomendados del recurso natural y en la mayor parte de los sitios analizados.

Cabe destacar, sin embargo, que se presentaron notables variaciones a través de los años en los parámetros evaluados y entre los distintos sitios de muestreo. En este sentido, los muestreos realizados en el año 2009 reflejan valores que exceden los niveles guía únicamente para el pH y N-amoniaco en el sitio Puerto Piray, año durante el cual no fue posible estimar el valor de la demanda bioquímica de Oxígeno (D.B.O.) en ninguna de las muestras. Posteriormente, durante los años 2010 y 2011, tanto estos parámetros como los nitrógenos de nitritos (N-nitritos) y los fenoles se encontraron fuera de los límites para varios de los sitios de muestreo. Los valores más elevados correspondieron a los sitios Posadas y Puerto Piray. La D.B.O. mostró valores extremadamente elevados para este último sitio en el año 2011, superando también los niveles guía para todos los usos del recurso y valores muy reducidos de pH, encontrándose este parámetro incluso fuera del límite máximo admisible para descarga de efluentes industriales a cursos receptores, de acuerdo con la Ley 2267 de la Provincia de Misiones (ver Anexo II).

Tal como puede observarse en las tablas I, II y III, otros parámetros como conductividad, turbidez, nitrógeno orgánico total (NOT) y fósforo total, también mostraron diferencias entre los distintos sitios de muestreo, con valores superiores para Puerto Piray y en menor medida para Posadas y Puerto Mineral. Sin embargo, si bien son parámetros que debido a su implicancia se incluyen en la elaboración de índices generales de calidad de agua, la normativa vigente no contempla niveles guía para ninguno de ellos.

Tabla I: Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos analizados en las muestras de agua del Río Paraná correspondientes al año 2009

Parámetros	Sitios de Muestreo			
	Iguazú	Pto. Piray	Pto. Mineral	Posadas
T° Agua in situ (°C)	22,0	23,5	21,4	18,9
T° Ambiente in situ (°C)	17,0	20,0	20,0	20,0
O ₂ disuelto in situ (mg/l)	8,06	8,20	8,24	8,19
pH In situ (UpH)	7,19	6,09 ^{a,b,c,d}	6,54	7,18
Conductividad (µS/cm)	49,40	125,80	29,00	51,04
NOT (mg/l)	0,62	1,38	0,79	1,15
N-Nitratos (mgN/l)	0,30	0,50	0,40	0,40
N-Nitritos (mgN/l)	0,005	0,024	0,007	0,006
N-Amoniacal (mgN/l)	0,010	0,030 ^d	0,020	0,020
Fósforo total (mgP/l)	0,016	0,100	0,034	0,020
Ortofosfato disuelto (mg/l)	0,01	0,02	0,01	0,01
Alcalinidad Total (mgCO ₃ Ca/l)	20	20	20	22
Dureza Total (mgCO ₃ Ca/l)	24	36	22	21
Turbidez (NTU)	3,0	16,0	5,0	3,4
Fenoles (mg/l)	0,001	<0,001	<0,001	0,001

^a Valores que exceden los niveles guía de agua para consumo humano con tratamiento convencional; ^b valores que exceden los niveles guía de agua para actividades recreativas con contacto directo; ^c valores que exceden los niveles guía de agua para actividades agropecuarias; ^d valores que exceden los niveles guía de protección vida acuática.

Tabla II: Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos analizados en las muestras de agua del Río Paraná correspondientes al año 2010

Parámetros	Sitios de Muestreo			
	Iguazú	Pto. Piray	Pto. Mineral	Posadas
T° Agua in situ (°C)	23,0	24,0	24,0	23,5
O ₂ disuelto in situ (mg/l)	8,55	6,95	6,70	7,90
pH In situ (UpH)	6,60	6,10 ^{a,b,c,d}	6,47 ^{a,b,c,d}	6,21 ^{a,b,c,d}
Conductividad (µS/cm)	50,95	66,70	53,70	62,70
NOT (mg/l)	0,34	0,40	0,36	0,32
N-Nitratos (mgN/l)	0,75	0,55	0,80	0,40
N-Nitritos (mgN/l)	0,009	0,009	0,013	0,020
N-Amoniacal (mgN/l)	0,035 ^d	0,080 ^d	0,095 ^d	0,600 ^{a,d}
Fósforo total (mgP/l)	0,037	0,045	0,050	0,028
Ortofosfato disuelto (mg/l)	0,027	0,035	0,038	0,025
Alcalinidad Total (mgCO ₃ Ca/l)	19,0	19,0	19,5	30,0
Dureza Total (mgCO ₃ Ca/l)	19,0	24,0	19,5	28,5
Turbidez (NTU)	13,7	8,0	7,8	9,8
Fenoles (mg/l)	0,001	0,001	<0,001	0,003 ^{a,d}
D.B.O ₅ (mgO ₂ /l)	-	-	<2,0	<2,0

^a Valores que exceden los niveles guía de agua para consumo humano con tratamiento convencional; ^b valores que exceden los niveles guía de agua para actividades recreativas con contacto directo; ^c valores que exceden los niveles guía de agua para actividades agropecuarias; ^d valores que exceden los niveles guía de protección vida acuática.

Tabla III: Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos analizados en las muestras de agua del Río Paraná correspondientes al año 2011

Parámetros	Sitios de Muestreo			
	Iguazú	Pto. Piray	Pto. Mineral	Posadas
T° Agua in situ (°C)	28,4	24,4	23,6	21,8
O ₂ disuelto in situ (mg/l)	8,90	6,00	8,75	8,35
pH In situ (UpH)	5,50 ^{a,b,c,d}	5,20 ^{a,b,c,d}	6,05 ^{a,b,c,d}	6,50
Conductividad (µS/cm)	51,00	188,50	50,40	50,95
NOT (mg/l)	0,24	0,34	0,89	1,05
N-Nitratos (mgN/l)	0,30	0,50	0,35	0,55
N-Nitritos (mgN/l)	0,009	0,014	0,009	0,090 ^d
N-Amoniacal (mgN/l)	0,030 ^d	0,330 ^d	0,040 ^d	0,200 ^d
Fósforo total (mgP/l)	0,043	0,089	0,023	0,095
Ortofosfato disuelto (mg/l)	0,033	0,030	0,012	0,080
Alcalinidad Total (mgCO ₃ Ca/l)	18,00	18,00	18,50	20,00
Dureza Total (mgCO ₃ Ca/l)	20,00	39,00	20,50	21,50
Turbidez (NTU)	14,00	10,00	8,40	10,80
Fenoles (mg/l)	0,002 ^{a,d}	0,001	0,002 ^{a,d}	0,001
D.B.O ₅ (mgO ₂ /l)	<2,0	9,5 ^{a,b,c,d}	<2,0	2,0

^a Valores que exceden los niveles guía de agua para consumo humano con tratamiento convencional; ^b valores que exceden los niveles guía de agua para actividades recreativas con contacto directo; ^c valores que exceden los niveles guía de agua para actividades agropecuarias; ^d valores que exceden los niveles guía de protección vida acuática.

Debido a que el análisis individual de las variables involucradas en el monitoreo de calidad del agua representa un problema a causa de la cantidad y complejidad de las mismas, se elaboró un Índice de Calidad de Agua (ICA) el cual combina la información aportada por cada uno de los siguientes parámetros: pH, D.B.O, Nitratos, Fosfatos, Temperatura, Turbidez, Conductividad y Oxígeno Disuelto. Todos estos parámetros se concentraron en un único valor fácilmente comprensible y comparable entre los sitios de muestreo seleccionados (Figura 3). De esta manera, se logró la valoración de una condición del agua en los puntos particulares de toma de muestra.

Este ICA representa el primer índice estimado para la zona de estudio en la cuenca del Río Alto Paraná, ya que en el ámbito en que se inscribe el presente estudio no se han realizado hasta el momento tareas similares, razón por la cual se carece de un índice representativo de la región y no existen estándares de referencia para su cálculo.

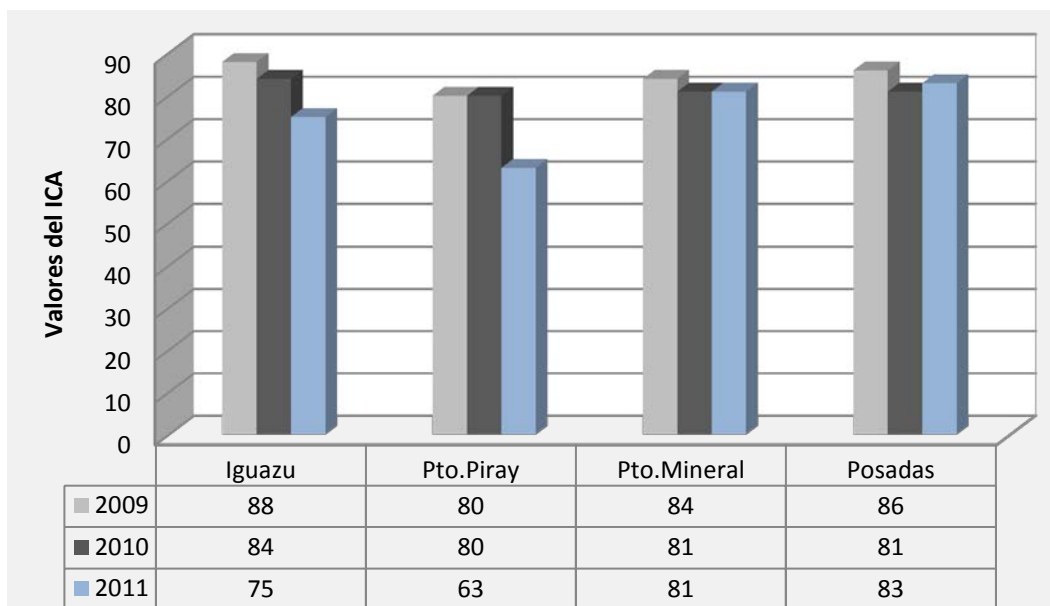


Figura 3. Índices de Calidad de Agua (ICA) entre los diferentes sitios de muestreo durante los años 2009, 2010 y 2011.

De acuerdo a los ICA obtenidos, se observó una tendencia general hacia la disminución progresiva en la calidad de las muestras de agua a través del tiempo, principalmente en los dos primeros sitios ubicados al norte de la Provincia. Claramente, las muestras pertenecientes a Pto. Piray mostraron los índices más bajos de calidad de agua en la secuencia de años 2009 a 2011, si bien no se registraron diferencias significativas entre los ICA por sitios en ninguno de los años. Seguidamente se encontraron los menores ICA para Pto. Mineral, Posadas y en último lugar Iguazú en lo que respecta a los años 2009 y 2010. Sin embargo, en el transcurso del año 2011 los índices de calidad registraron un ligero incremento a la altura de Pto. Mineral y Posadas en relación al año anterior; en tanto los ICA correspondientes a Pto. Piray e Iguazú experimentaron un descenso notable.

Los descriptores asignados a cada rango de valores de ICA, indican que las muestras de agua son de buena calidad, a excepción de Pto. Piray en el año 2011, cuyos valores le asignan calidad media de sus aguas (tabla IV).

Tabla IV: Descriptores de calidad del agua de acuerdo al rango numérico obtenido en función del Índice de Calidad de Agua (ICA) desarrollado por la Fundación de Sanidad Nacional (NSF) de los Estados Unidos.

Descriptor	Rango Numérico
Muy malo	0-25
Malo	26-50
Medio	51-70
Bueno	71-90
Excelente	91-100

Los compuestos orgánicos constituidos por aminas, hidrocarburos, bifenilos policlorados, pesticidas, fenoles y compuestos sulfurados que se hallaron presentes en las muestras de agua, fueron cuantificados en conjunto (figura 4).

Este análisis se llevó a cabo para las muestras de agua colectadas durante el mes de noviembre de 2011, correspondiente al último año del presente estudio. Por lo tanto, los datos obtenidos no pudieron ser incluidos en el cálculo de los ICA respectivos, debido a la imposibilidad de compararlos a través del tiempo.

La información aportada por estos análisis evidenció que los compuestos orgánicos detectados también mostraron variaciones entre los distintos sitios de muestreo para el periodo mencionado. Se observó un incremento en la concentración de dichas sustancias a lo largo del trayecto del río, desde el tramo superior (Iguazú) hacia el tramo inferior (Posadas), donde se detectaron los valores más elevados. La excepción estuvo dada por el sitio Puerto Piray, donde se vio una notable disminución de los compuestos orgánicos presentes en relación con todos los sitios restantes. Esta situación refleja una diferencia importante respecto de los parámetros fisicoquímicos analizados anteriormente, donde diversos valores superaron los niveles guías permitidos, lo cual se tradujo en ICAs inferiores para este sitio durante todos los años de estudio. Sin embargo, hay que tener en cuenta que dichos datos fueron obtenidos a partir de un único muestreo realizado en los sitios de interés y, por lo tanto, podrían reflejar un estado transitorio particular.

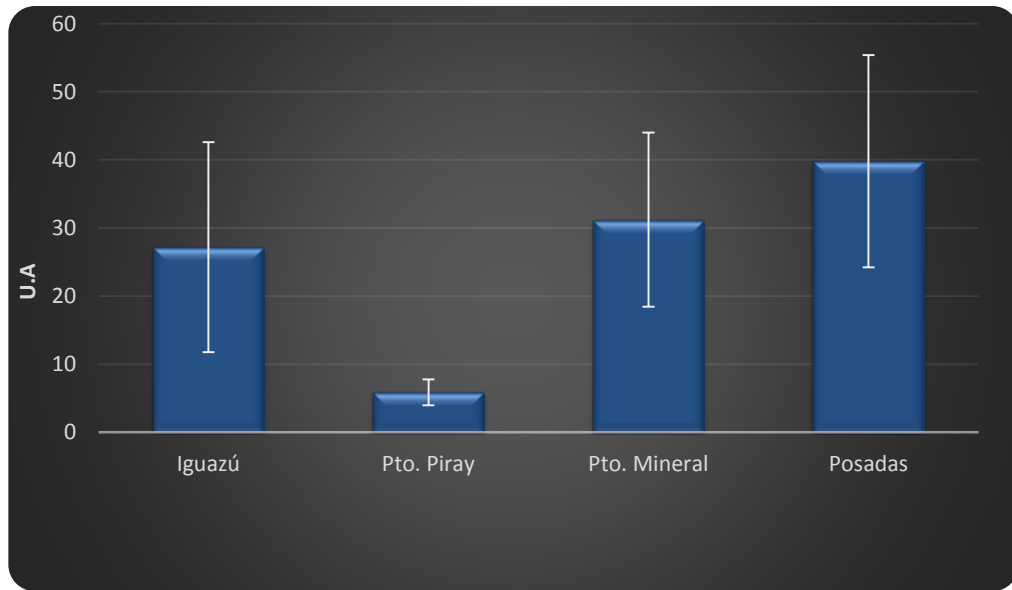


Figura 4. Área de picos para compuestos orgánicos presentes en las distintas muestras de agua del Río Paraná, determinadas mediante cromatografía gaseosa con detector de captura electrónica (GC-ECD) y expresadas en unidades arbitrarias (u.a.). Las barras sobre las columnas indican el desvío estándar.

SECCIÓN II

ENSAYOS *IN VIVO*

***Corbicula fluminea* (Müller, 1774)**

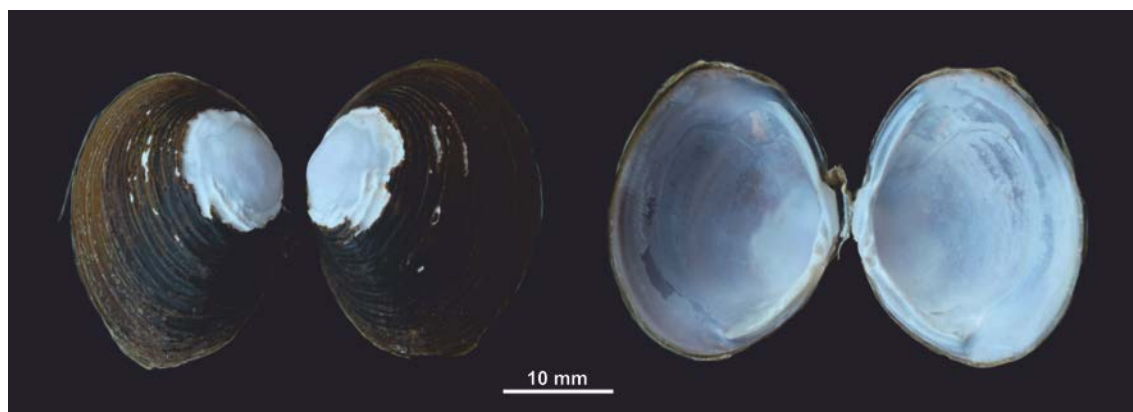


Figura 5. Ejemplar de *Corbicula fluminea*. Vista externa e interna de ambas valvas.

La longitud total media de los 145 ejemplares de *Corbicula fluminea* (figura 5) empleados durante los tres años comprendidos por el estudio, se presentan en la tabla V en función del sitio de muestreo y/o controles correspondientes.

Tabla V: Longitud total media de los 145 ejemplares de *C. fluminea* empleados durante todo el periodo de estudio (2009-2011) expresado como Media \pm Desvío Estándar (M \pm DE)

Tratamientos	<i>Corbicula fluminea</i> (M \pm DE)
Control Negativo	2,38 \pm 0,55
Iguazú	2,07 \pm 0,53
Pto. Piray	2,37 \pm 0,48
Pto. Mineral	2,31 \pm 0,54
Posadas	2,22 \pm 0,35
Control Positivo	2,42 \pm 0,43

Los bioensayos realizados con muestras de agua pertenecientes a Puerto Piray y Posadas fueron los únicos en los que se observó mortalidad de los ejemplares expuestos. Partiendo de 11 individuos en cada caso, los porcentajes de mortalidad fueron del 27 % (3 ejemplares muertos al noveno día de exposición) para el tratamiento Posadas en el año 2010 y del 9 % (1 ejemplar muerto al segundo día de exposición), luego del tratamiento con muestras de agua pertenecientes a Pto. Piray durante el año 2011.

ENSAYO COMETA:

Los datos obtenidos luego de la aplicación del Ensayo Cometa en células de hemolinfa de *C. fluminea* expuestas durante 3 y 10 días a los distintos tratamientos (muestras de agua del Río Paraná) y controles, presentaron una distribución normal de acuerdo al análisis resultante del test de normalidad de Shapiro-Wilks. Los valores de p estuvieron comprendidos entre 0,0637 y 0,5847 para todos los años. Asimismo, la prueba F mostró varianzas homogéneas con valores de p entre 0,1097 y 0,9752. Por lo tanto, dichos datos fueron estadísticamente comparados aplicando el test paramétrico de análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher.

En todos los casos, la viabilidad celular fue superior al 90 %.

El mayor índice de daños (ID) en el ADN de células de hemolinfa de *C. fluminea* detectado luego de la exposición aguda de 3 días, se obtuvo para el sitio Puerto Piray (figura 6). El grado de daño genotóxico encontrado tanto en el año 2010 como 2011 fue superior incluso al inducido por el control positivo, con valores de ID= 37,8 y 33 frente a un ID= 32,5.

La comparación de los resultados en función del tiempo, mostraron los mayores niveles de daño en el ADN durante los años 2010 y 2011, con incrementos de hasta seis veces en los valores de ID y diferencias significativas en relación al control negativo ($p < 0,01$ – $p < 0,05$) para los sitios Pto. Piray, Pto. Mineral y Posadas. Estos datos coincidieron con una disminución en los valores del ICA obtenidos para este periodo.

Tal como pudo apreciarse, de los tres sitios mencionados anteriormente, Pto. Piray fue el único que mostró diferencias estadísticas significativas respecto al control durante los tres años de estudio.

En relación a los bioensayos conducidos durante 10 días, existió una notable disminución en el número de células con daño, particularmente en los casos en que se presentaron índices muy elevados de daño en el ADN luego de los tratamientos agudos (figura 7). Este fue el caso de los resultados obtenidos para los sitios Pto. Piray y Pto. Mineral en el año 2010, donde los ID disminuyeron significativamente ($p < 0,05$). De hecho, salvo la única excepción de Pto. Piray durante el 2011 (ID= 24; $p < 0,05$), no se detectaron diferencias significativas en relación al control negativo para ninguno de los sitios al concluir el décimo día de exposición.

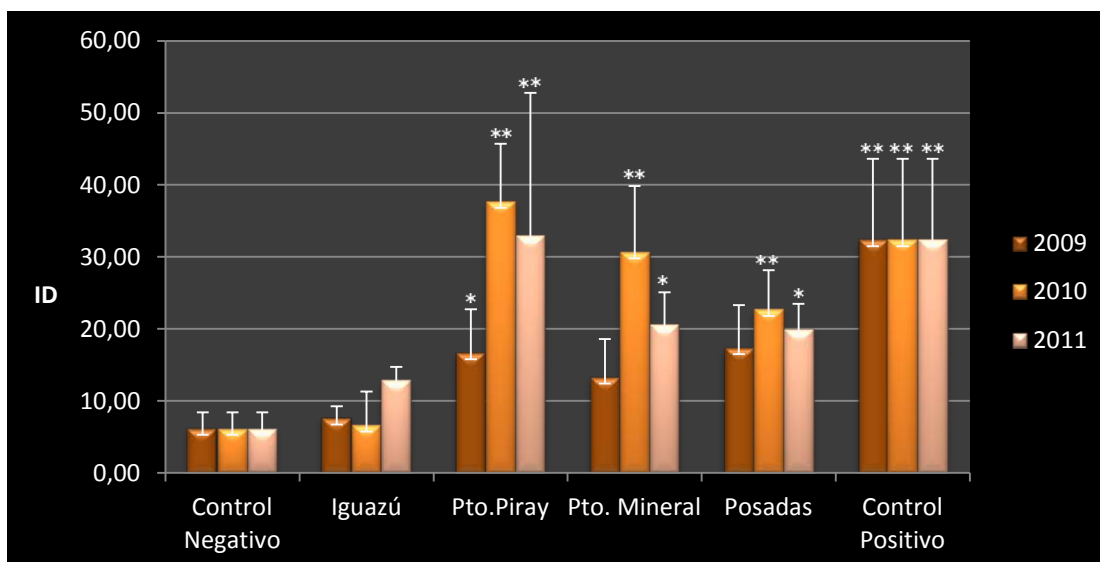


Figura 6. Índices medios de daño en el ADN ($ID \pm DE$) de hemocitos de *C. fluminea* detectados mediante Ensayo Cometa luego de tres días de exposición a muestras de agua del río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011. Diferencias significativas respecto al control negativo determinadas mediante ANOVA y LSD de Fisher: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

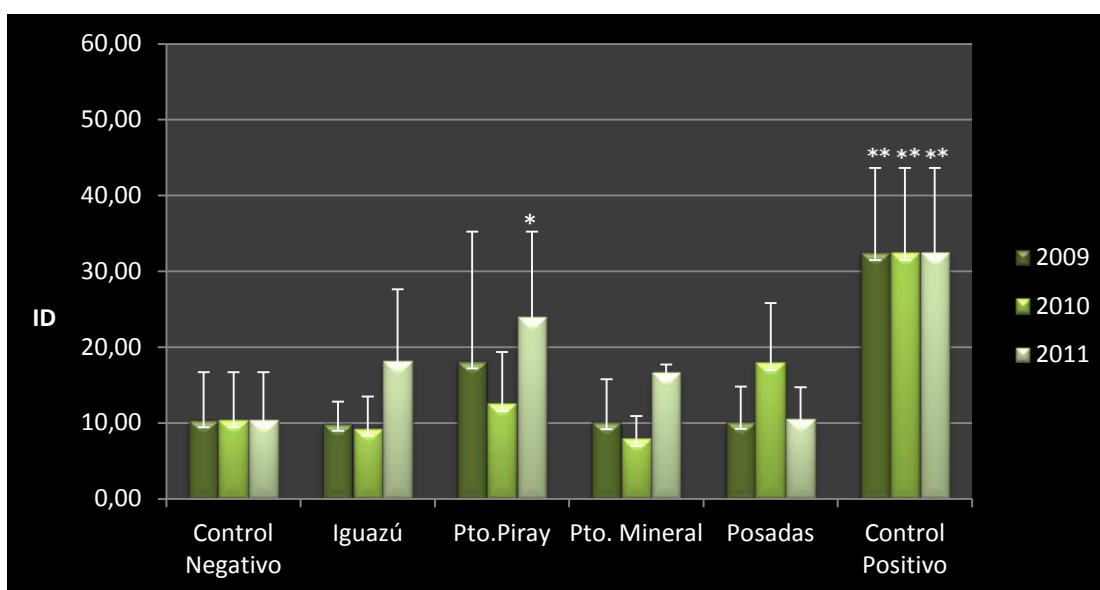


Figura 7. Índices medios de daño en el ADN ($ID \pm DE$) de hemocitos de *C. fluminea* detectados mediante Ensayo Cometa luego de diez días de exposición a muestras de agua del río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011. Diferencias significativas respecto al control negativo determinadas mediante ANOVA y LSD de Fisher: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Entre las células con daño, que representaron aproximadamente el 14 % del total de los nucleoides analizados, la mayor parte se agrupó en la clase de cometa tipo 1, es decir, en la clase que representa daño leve. En menor proporción, se encontraron cometas

pertenecientes a las clases 2, 3 y 4, que representan daño de moderado a severo, respectivamente (figura 8).

El mayor número de células con daño en las diversas categorías de cometas, se observó para el tratamiento agudo con aguas de Pto. Mineral en el año 2010. En este caso, el 33 % de los nucleoides analizados mostraron daño, de los cuales el 29 % correspondió a cometas de clase 1. Con estos valores, superó en un 9 % a los cometas de esta categoría encontrados en el control positivo (ver anexo III: tablas I - VI).

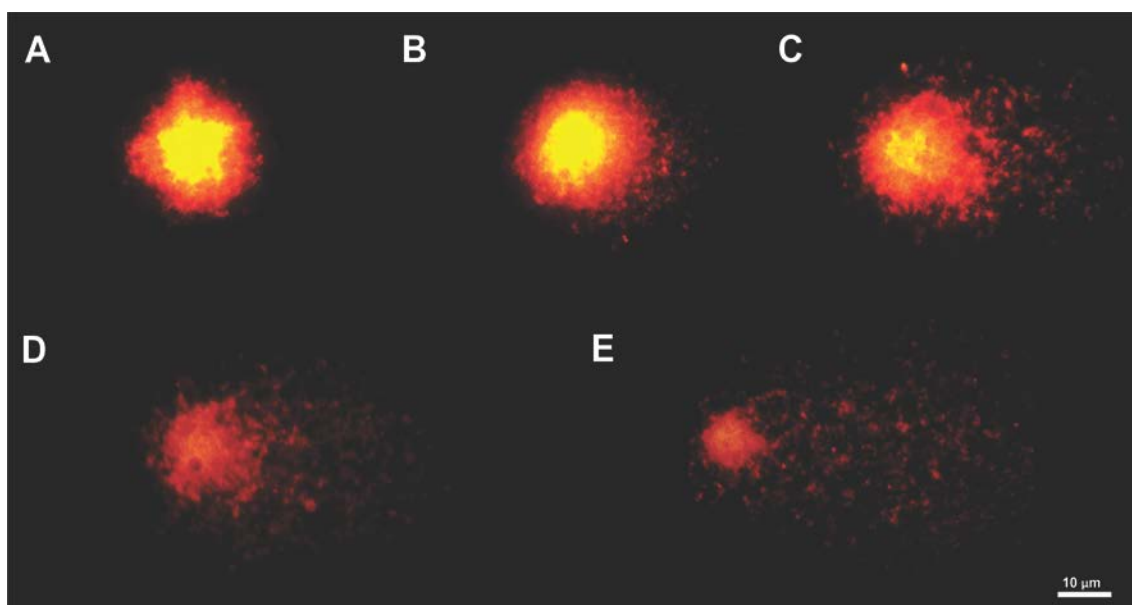


Figura 8. Lesiones en el ADN de células de hemolinfa de *C. fluminea* detectadas mediante ensayo cometa luego de tratamientos con aguas del río Paraná: A) clase 0; B) clase 1, C) clase 2; D) clase 3 y E) clase 4. Aumento: 1000X

TEST DE MICRONÚCLEOS (MN) Y ALTERACIONES DE LA MORFOLOGÍA NUCLEAR (AMN):

El análisis de Shapiro Wilks aplicado a los datos procedentes de estos ensayos con un intervalo de confianza del 95 %, arrojó valores de $p < 0,0001$ para el test de MN y de $p < 0,0001 - p < 0,004$ para las AMN, tanto a los 3 como a los 10 días de exposición en todos los años. Las diferencias significativas observadas demostraron que estos datos no siguen una distribución normal y, por lo tanto, fueron comparados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Las frecuencias de MN y AMN fueron estimadas de manera independiente para los dos tipos celulares encontrados en los extendidos de hemolinfa: hialinocitos y granulocitos. Las AMN se vieron únicamente en este último tipo celular, donde también se registraron en términos generales las frecuencias más elevadas de MN.

Las características diferenciales de cada grupo de hemocitos se basaron principalmente en la coloración, tamaño y forma de las células; así como en la posición del núcleo y la presencia de estructuras granulares en el citoplasma.

Los denominados granulocitos se caracterizaron por una coloración azulada luego de la fijación en metanol y coloración con Giemsa. Presentaron mayor tamaño que los hialinocitos, con formas redondeadas a ovaladas y ocasionalmente con presencia de pseudópodos. Los núcleos generalmente en posición excéntrica y con citoplasma provisto de estructuras granulares más o menos diferenciadas.

Por otra parte, los hemocitos denominados hialinocitos, de menor tamaño, presentaron contornos circulares discretos sin emisión de pseudópodos y coloración rosa homogénea luego de su tinción con Giemsa. Los núcleos en posición central y citoplasma desprovisto de gránulos (figura 9).

Las respuestas de ambos tipos celulares fueron variables en función de los años de estudio y del tiempo de exposición a los tratamientos respectivos (Anexo IV: tablas I - VI).

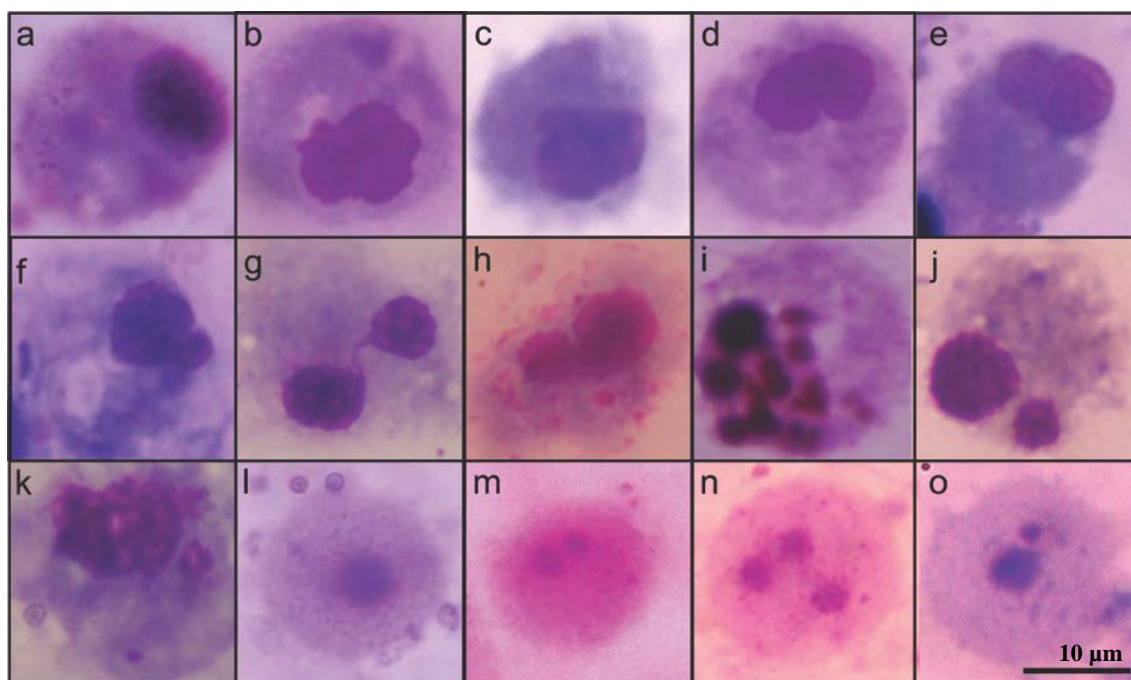


Figura 9. Células en extendidos de hemolinfa de *C. fluminea* luego de tratamientos con aguas del río Paraná: a) granulocito normal; b) granulocito con núcleo lobulado (*lobed*); c) granulocito con núcleo globular (*blebbed*); d) y h) granulocito con núcleo en forma arriñonada (*notched*); e) granulocito con núcleo en forma de ocho (*eightshaped*); f) granulocito con gemación nuclear (*bud*); g) granulocito con puente cromatínico nuclear; i) granulocito con núcleo fragmentado (apoptótico); j) y k) granulocitos con micronúcleos; l) hialinocito normal; m) hialinocito binucleado; n) hialinocito trinucleado; o) hialinocito con micronúcleo. Aumento: 1000X

En el caso de los granulocitos, las frecuencias más elevadas de MN se obtuvieron durante el año 2011 para los sitios Pto. Piray al tercer día de exposición y Posadas al décimo día de exposición (figura 10). Estas frecuencias se vieron acompañadas por un porcentaje de 0,05 % y 0,06 % de núcleos fragmentados respectivamente, manifestando eventos presumiblemente apoptóticos.

Durante el año 2009, solo se registraron diferencias significativas respecto al control negativo luego de diez días de exposición a muestras de agua pertenecientes al sitio Pto. Piray ($p < 0,01$). En los años siguientes, con excepción de Posadas, se observó una tendencia general hacia una reducción de aproximadamente el 50 % en el daño genotóxico detectado entre el tercer y décimo día de exposición. De esta manera, sitios que mostraron diferencias significativas para las frecuencias de MN luego de tres días de exposición, como Pto. Piray ($p < 0,01$) y Pto. Mineral ($p < 0,05$), disminuyeron significativamente dichas frecuencias al cabo de los diez días de exposición.

Posadas, por otra parte, exhibió un comportamiento opuesto a los sitios restantes. Mostró un notable incremento en las frecuencias de MN de los granulocitos entre el tercer

y décimo día de exposición con diferencias estadísticas significativas respecto al control negativo ($p < 0,01$).

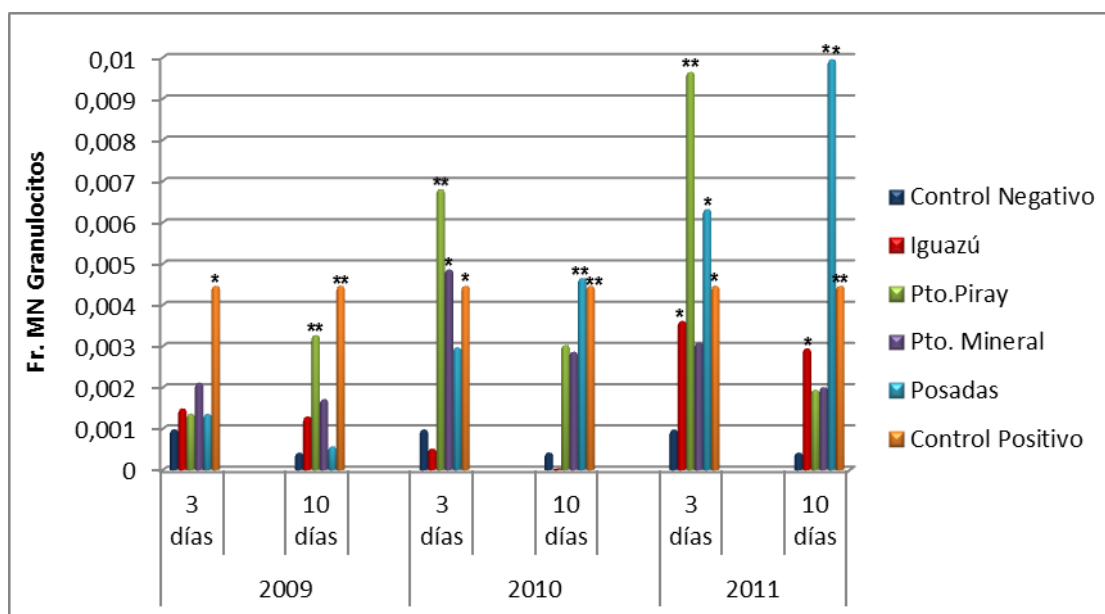


Figura 10. Frecuencias (Fr.) de MN en granulocitos de hemolinfa de *C. fluminea* luego de 3 y 10 días de exposición a muestras de agua del río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011. Diferencias significativas respecto al control negativo determinadas mediante Kruskal-Wallis: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

La respuesta de los hialinocitos a las muestras de agua del río Paraná fue más atenuada, con valores inferiores en las frecuencias de MN en relación con los granulocitos.

Se observaron diferencias significativas respecto al control negativo luego de los bioensayos de exposición aguda para la mayoría de los sitios evaluados durante el año 2010 y 2011 (figura 11). Los valores más elevados de MN se obtuvieron para Pto. Piray al décimo día de exposición durante el año 2010 y para Posadas al tercer día de exposición en el año 2011.

La disminución en respuesta al daño genotóxico entre el tercer y décimo día de exposición, tal como fuera apreciada en los granulocitos, solo fue observada para este tipo celular en los tratamientos realizados durante el año 2011. En este caso, todos los sitios que presentaron diferencias significativas en relación al control negativo al tercer día de exposición, es decir, Pto. Piray ($p < 0,05$), Pto. Mineral ($p < 0,05$) y Posadas ($p < 0,01$), disminuyeron sus frecuencias de MN al alcanzar el décimo día de exposición sin diferenciarse del control negativo. Sin embargo, durante el 2010 se advirtió un

comportamiento inverso asociado con un incremento del daño en función del tiempo de exposición con la única excepción del sitio correspondiente a Iguazú.

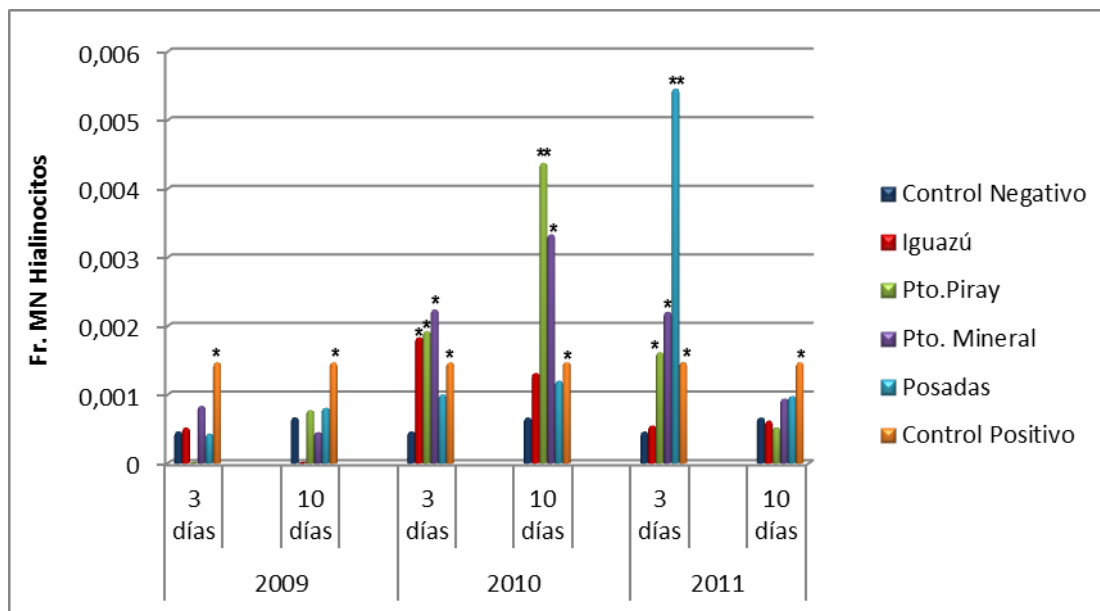


Figura 11. Frecuencias (Fr.) de MN en hialinocitos de hemolinfa de *C. fluminea* luego de 3 y 10 días de exposición a muestras de agua del río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011. Diferencias significativas respecto al control negativo determinadas mediante Kruskal-Wallis: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

También se encontraron en los extendidos de hemolinfa numerosos hialinocitos binucleados y trinucleados (figura 9 m, 9 n y figura 12). Si bien las células multinucleadas son consideradas como un tipo de alteración generada por diferentes sustancias con potencialidad genotóxica y/o mutagénica, en este caso las frecuencias se mantuvieron estables y proporcionadas en todos los tratamientos (incluyendo los controles). De hecho, a diferencia de lo ocurrido con los MN, cuyas frecuencias se incrementaron en los últimos años del estudio paralelamente a la disminución de los ICA respectivos, la proporción de hialinocitos binucleados y trinucleados se redujo secuencialmente. Por lo tanto, sus frecuencias celulares se contabilizaron de manera independiente.

Por otra parte, también fueron halladas unas pocas células constituidas por cuatro núcleos (tetranucleadas) en los tratamientos correspondientes a Iguazú, Pto. Mineral y Posadas únicamente durante el año 2009 y, por lo tanto, no fueron incluidas en las figuras correspondientes.

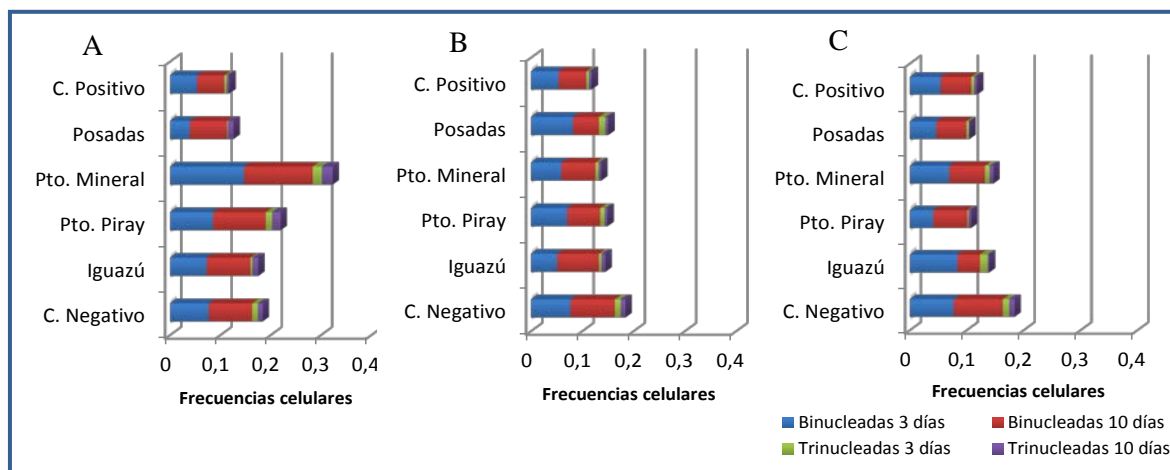


Figura 12. Frecuencias de hialinocitos binucleados y trinucleados en *C. fluminea*, estimadas en función del total de hemocitos contabilizados por tratamiento con muestras de agua del río Paraná y controles luego de tres y diez días de exposición durante los años 2009 (A), 2010 (B) y 2011 (C).

En cuanto a las frecuencias de AMN determinadas en la subpoblación celular de granulocitos, se observó una correlación entre los sitios que presentaron diferencias significativas respecto al control negativo para este tipo de alteraciones nucleares y para las frecuencias de MN (figura 13). Esta correspondencia fue más evidente luego de los bioensayos de exposición aguda durante los tres años consecutivos. Con respecto a los datos obtenidos luego de diez días de exposición, las AMN también disminuyeron los valores de sus frecuencias, aunque mantuvieron diferencias significativas respecto al control negativo en la mayor parte de los sitios analizados. Esto se vio particularmente en el año 2011, donde todas las muestras de agua fueron significativamente superiores al control negativo ($p < 0,01$ – $p < 0,05$). Cabe destacar que esto puede deberse a que las frecuencias de AMN para el control negativo durante este tiempo de exposición, fueron aproximadamente seis veces menores que las obtenidas al tercer día de exposición, acentuando las diferencias respecto a los tratamientos.

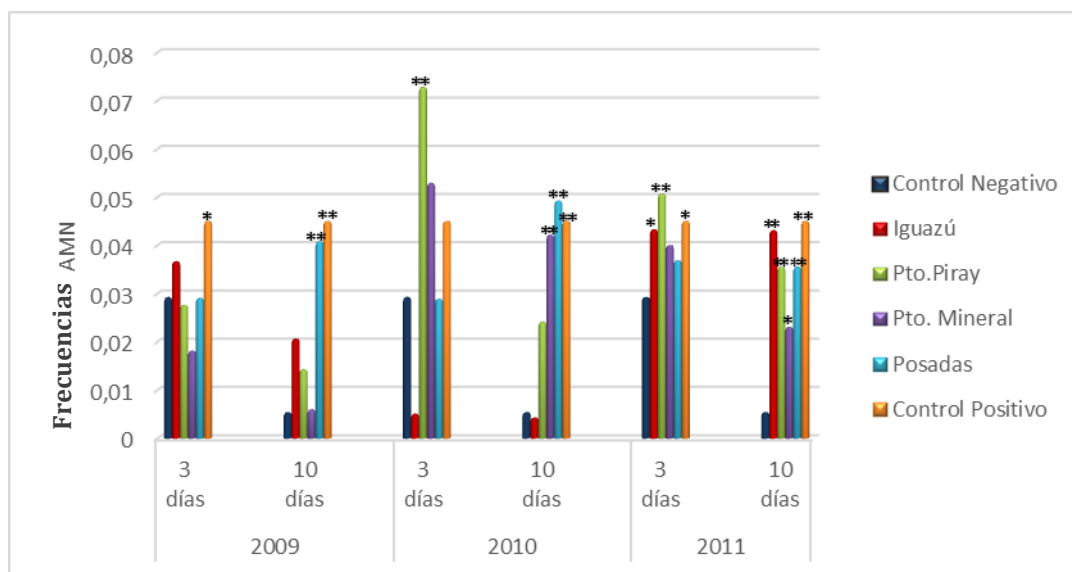


Figura 13. Frecuencias de Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en granulocitos de *C. fluminea* expuestos durante tres y diez días a muestras de agua del río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011. Diferencias significativas respecto al control negativo determinadas mediante Kruskal-Wallis: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

La distribución de las AMN entre las diversas categorías de clasificación, permitió establecer que las alteraciones en los núcleos de tipo lobulados (*lobed*) y con gemaciones (*buds*), fueron las más frecuentes tanto al tercer como décimo día de exposición a todos los tratamientos y controles durante los tres años consecutivos (figura 14).

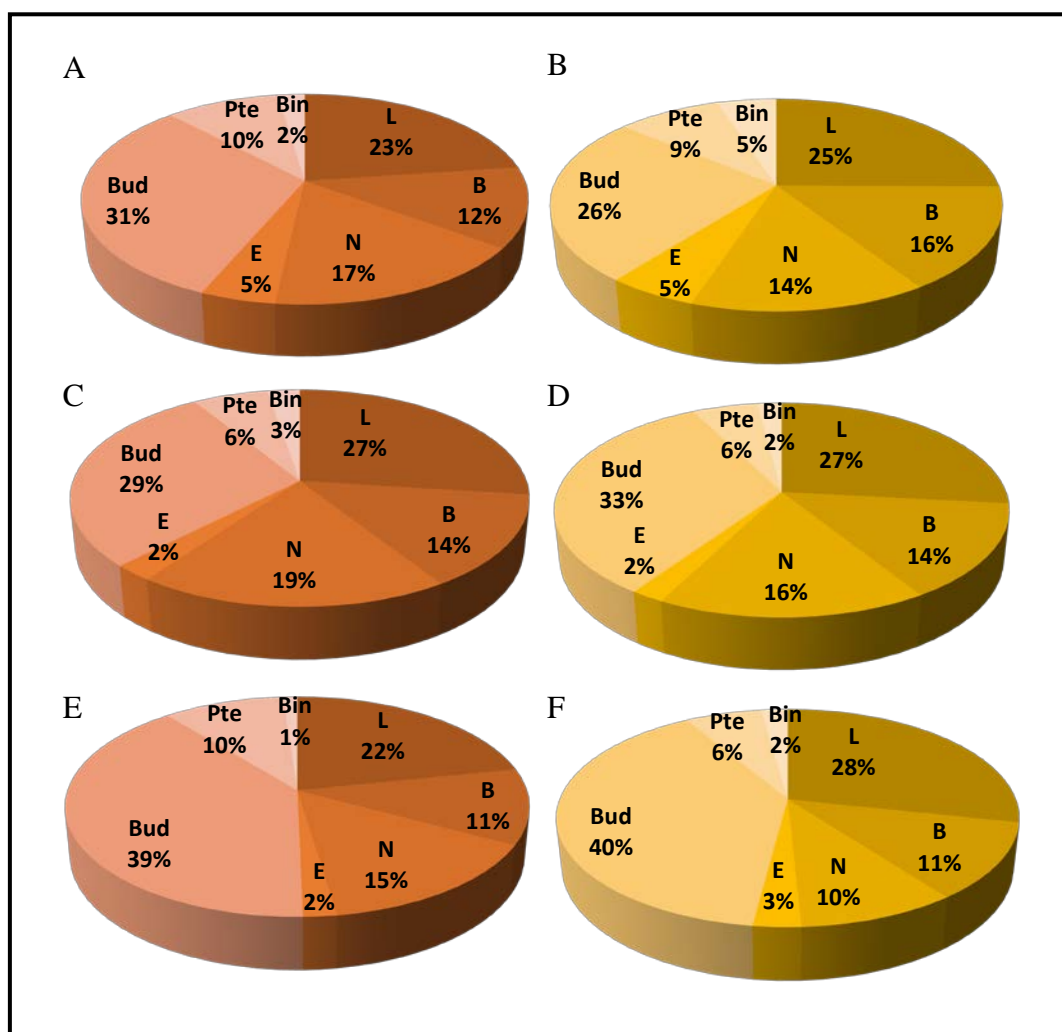


Figura 14. Porcentajes de distribución de los tipos de AMN encontradas en granulocitos de hemolinfa de *C. fluminea* luego de 3 días de exposición (columna izquierda en color naranja) y 10 días de exposición (columna derecha en color amarillo) a los tratamientos con muestras de agua del río Paraná durante los años 2009 (A y B), 2010 (C y D) y 2011 (E y F). L: *Lobed*; B: *Blebbled*; N: *Notched*; E: *Eightshaped*; Bud: Gemaciones; Pte.: Puentes cromáticos; Bin: células binucleadas.

Limnoperna fortunei (Dunker, 1857)



Figura 15. Ejemplar de *Limnoperna fortunei*. Vista externa e interna de valva derecha.

La longitud total media de los 158 ejemplares de *Limnoperna fortunei* (figura 15) empleados durante los tres años comprendidos por el estudio, se presentan en la tabla VI en función del sitio de muestreo y/o controles correspondientes.

Tabla VI: Longitud total media de los 158 ejemplares de *L. fortunei* empleados durante todo el periodo de estudio (2009-2011) expresado como Media \pm Desvío Estándar (M \pm DE)

Tratamientos	<i>L. fortunei</i> (M \pm DE)
C. Negativo	2,41 \pm 0,38
Iguazu	2,25 \pm 0,41
Pto. Piray	2,44 \pm 0,44
Pto. Mineral	2,43 \pm 0,46
Posadas	2,47 \pm 0,62
C. Positivo	2,56 \pm 0,38

El porcentaje de mortalidad de los mejillones durante los tratamientos, fue del 27% únicamente en los bioensayos realizados con muestras de agua procedentes de Pto. Piray en el año 2011. En este caso, del total de 11 ejemplares expuestos, uno de ellos murió al segundo día y otros dos, al octavo día de iniciada la exposición.

ENSAYO COMETA:

El análisis de normalidad de los datos obtenidos a partir del Ensayo Cometa en células de hemolinfa de *L. fortunei* mediante el test de Shapiro-Wilks, arrojó valores de *p* comprendidos entre 0,088 y 0,595; en tanto la prueba F para homogeneidad de varianzas mostró valores de *p* entre 0,065 y 0,937 con un intervalo de confianza del 95 % en ambos

casos. Este rango de valores de p se obtuvo tanto para los ensayos de exposición de tres como diez días a los distintos tratamientos y controles. Por lo tanto, se consideró una distribución normal de los índices de daño en el ADN evaluados mediante Ensayo Cometa y los mismos fueron contrastados estadísticamente aplicando el test paramétrico de análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher.

La viabilidad celular fue superior al 90 % para todos los tratamientos realizados. El mayor índice de daños (ID) detectado en el ADN de células de hemolinfa de *L. fortunei* expuestas durante tres días a los distintos tratamientos, correspondió al sitio Puerto Piray durante los tres años consecutivos del estudio (figura 16). Sin embargo, sólo alcanzaron diferencias significativas respecto al control negativo los ID obtenidos durante los años 2010 y 2011 ($p < 0,01$), considerablemente más elevados (ID= 47, 67 y 43,4 respectivamente) que su contraparte del año 2009 (ID= 17,5). De hecho, durante estos dos últimos años, el daño genotóxico fue incluso superior al inducido por el control positivo y no se hallaron diferencias estadísticas respecto al mismo.

En relación a los sitios de muestreo restantes, si bien se hallaron valores elevados en los índices de daño al ADN para Pto. Mineral y Posadas, principalmente durante los años 2010 y 2011, no se obtuvieron diferencias significativas en relación al control negativo en ningún caso.

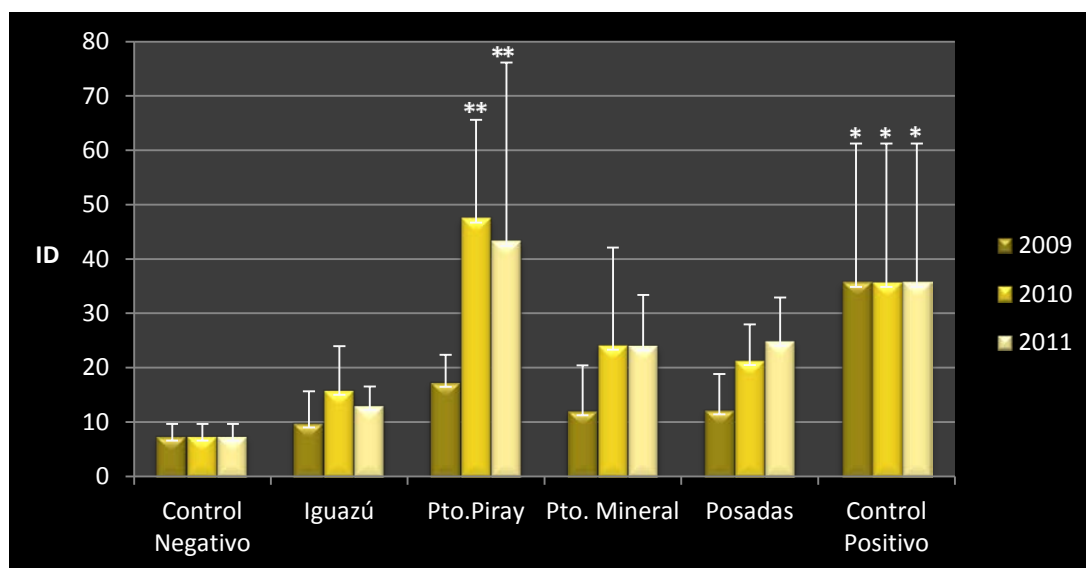


Figura 16. Índices medios de daño en el ADN ($ID \pm DE$) de hemocitos de *L. fortunei* detectados mediante Ensayo Cometa luego de 3 días de exposición a muestras de agua del Río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011. Diferencias significativas respecto al control negativo determinadas mediante ANOVA y LSD de Fisher: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Con respecto a los bioensayos conducidos durante diez días, se observó una tendencia hacia la disminución en el daño genotóxico causado por la exposición a las muestras de agua que evidenciaron los mayores ID al tercer día, aunque sin alcanzar diferencias estadísticas significativas (figura 17). Esta situación se presentó para los sitios Pto. Piray, Pto. Mineral y Posadas. En estos dos últimos puntos de muestreo, sin embargo, se observó una situación particular en los años 2009 y 2010. Si bien en dichos periodos los índices de daño no estuvieron entre los más elevados de la serie durante la exposición por tres días, dichos valores se incrementaron hasta alcanzar diferencias significativas en relación al control negativo ($p < 0,05$) al finalizar el décimo día de exposición.

En función del total de células analizadas por individuo, en todos los casos la mayor proporción de las mismas se concentró en el grupo de cometas de clase 0, de manera que el porcentaje promedio de células sin daño fue del 85 %.

Entre el 15 % restante de células con daño en su ADN, el principal tipo de cometas encontrados correspondió a la clase 1, cuyas proporciones variaron entre 6 % y 28 % de acuerdo al sitio de muestreo (ver anexo III, tablas IX – XII), seguidos secuencialmente por los cometas de clase 2, 3 y en mucho menor medida, de clase 4 (figura 18).

El número más elevado de nucleoides dañados en cada categoría, se obtuvo para los ensayos agudos con muestras de agua de Pto. Piray en el año 2010.

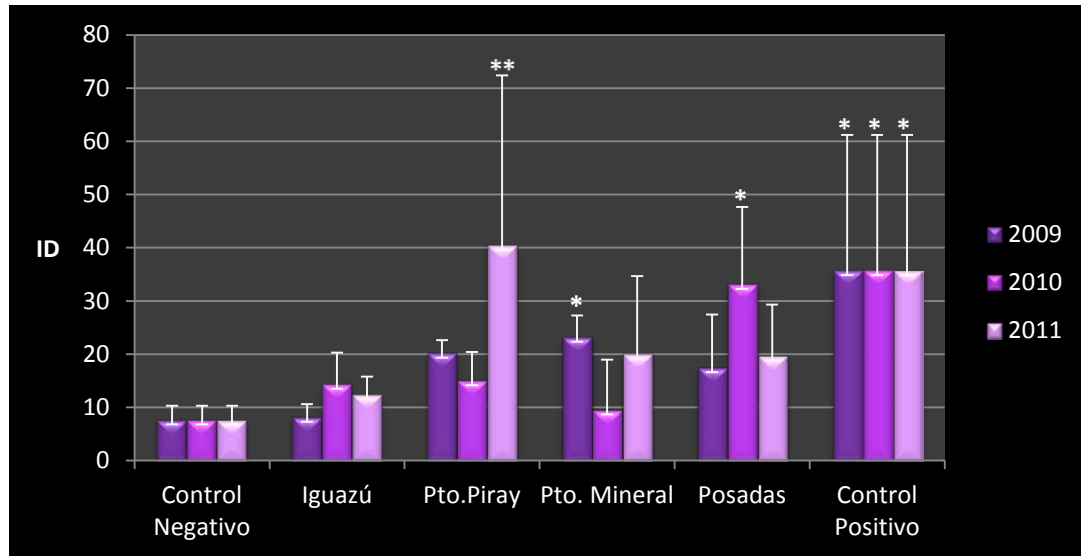


Figura 17. Índices medios de daño en el ADN (ID \pm DE) de hemocitos de *L. fortunei* detectados mediante Ensayo Cometa luego de 10 días de exposición a muestras de agua del río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011. Diferencias significativas respecto al control negativo determinadas mediante ANOVA y LSD de Fisher: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

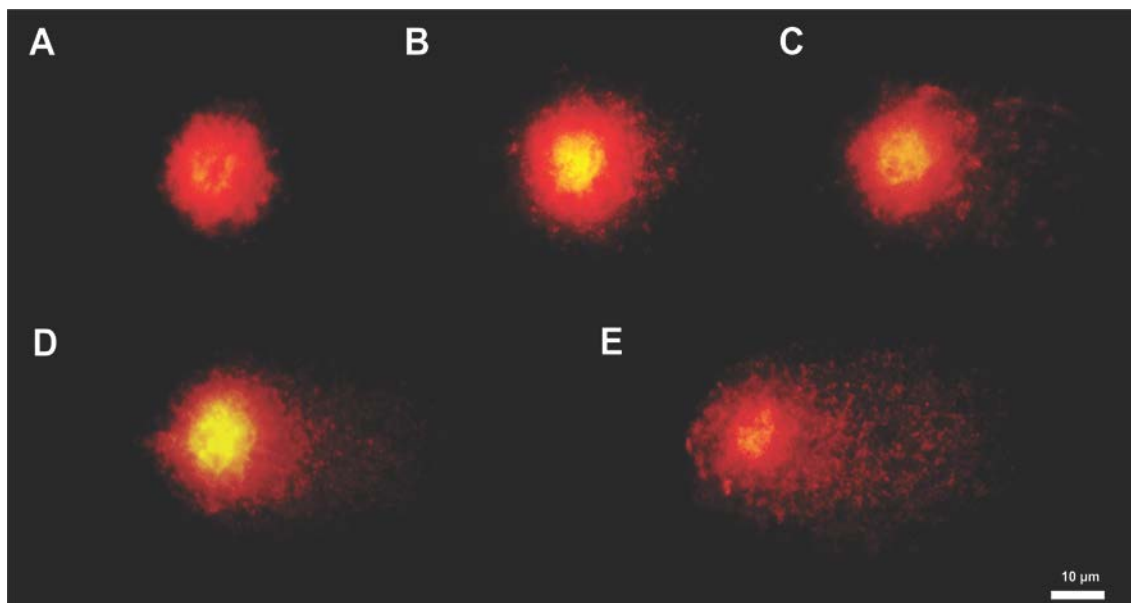


Figura 18. Lesiones en el ADN de células de hemolinfa de *L. fortunei* detectadas mediante ensayo cometa luego de tratamientos con aguas del río Paraná: A) clase 0; B) clase 1, C) clase 2; D) clase 3 y E) clase 4. Aumento: 1000X

TEST DE MICRONÚCLEOS (MN) Y ALTERACIONES DE LA MORFOLOGÍA NUCLEAR (AMN):

La aplicación del test de Shapiro Wilks a los datos obtenidos del test de MN y AMN mostró que dichos datos no siguieron una distribución normal ($p < 0,0001 - p = 0,028$) en ninguno de los tiempos de ensayo y años de estudio. Por ello, los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

En estos mejillones las frecuencias de MN y AMN fueron estimadas de manera independiente para los distintos tipos de hemocitos encontrados en los extendidos de hemolinfa.

Las características utilizadas para describir y diferenciar los granulocitos de los hialinocitos fueron las mismas que las descritas anteriormente para *C. fluminea*. En ambas especies, las alteraciones halladas en cada grupo de células fue similar (figura 19) y sólo se encontraron AMN en los granulocitos.

Comparando los sitios que reflejaron mayor incidencia de daño genotóxico expresado en este caso como micronúcleos, las respuestas de los granulocitos se mostraron más exacerbadas y similares a las obtenidas a través del ensayo cometa en función de los años (ver anexo IV, tablas VII – XII).

Las mayores frecuencias de MN en granulocitos se obtuvieron nuevamente para Pto. Piray en los dos últimos años de estudio: 0,006 para tres días de exposición y 0,005 luego de diez días de exposición, con diferencias significativas respecto al control negativo (figura 20). Estos resultados coinciden con la disminución de los ICA respectivos durante los mismos años (2010 y 2011) y porcentajes de hasta 0,14 % de núcleos fragmentados hallados en los extendidos de hemolinfa. Siguiendo a este sitio, otras de las frecuencias más elevadas de MN se encontraron en Pto. Mineral ($p < 0,05$ para diez días de exposición en el año 2011) con un 0,17 % de núcleos fragmentados y Posadas ($p < 0,05$ para tres días de exposición en el año 2011) con 0,15 % de sus núcleos fragmentados.

Por otra parte, la tendencia hacia la reducción del daño genotóxico al décimo día de exposición, no fue constante en todos los sitios de muestreo. De hecho, tal como puede observarse en la figura 20, se manifestaron respuestas muy variables entre los bioensayos realizados y entre los diferentes años.

En el caso de los hialinocitos, las únicas frecuencias de MN que alcanzaron diferencias significativas respecto al control negativo ($p < 0,05$) en el año 2010, correspondieron a Pto. Piray y Pto. Mineral (figura 21). En general, las frecuencias de los

sitios restantes a través de los años fueron relativamente bajas y uniformes. Una excepción muy particular fue el caso registrado para el sitio Iguazú, que manifestó al décimo día de exposición en el año 2011, las frecuencias más elevadas de MN de toda la serie de bioensayos realizados para esta especie (Fr. MN= 0,0052; $p < 0,01$), como también el mayor porcentaje de núcleos en proceso apoptótico (0,3 %).

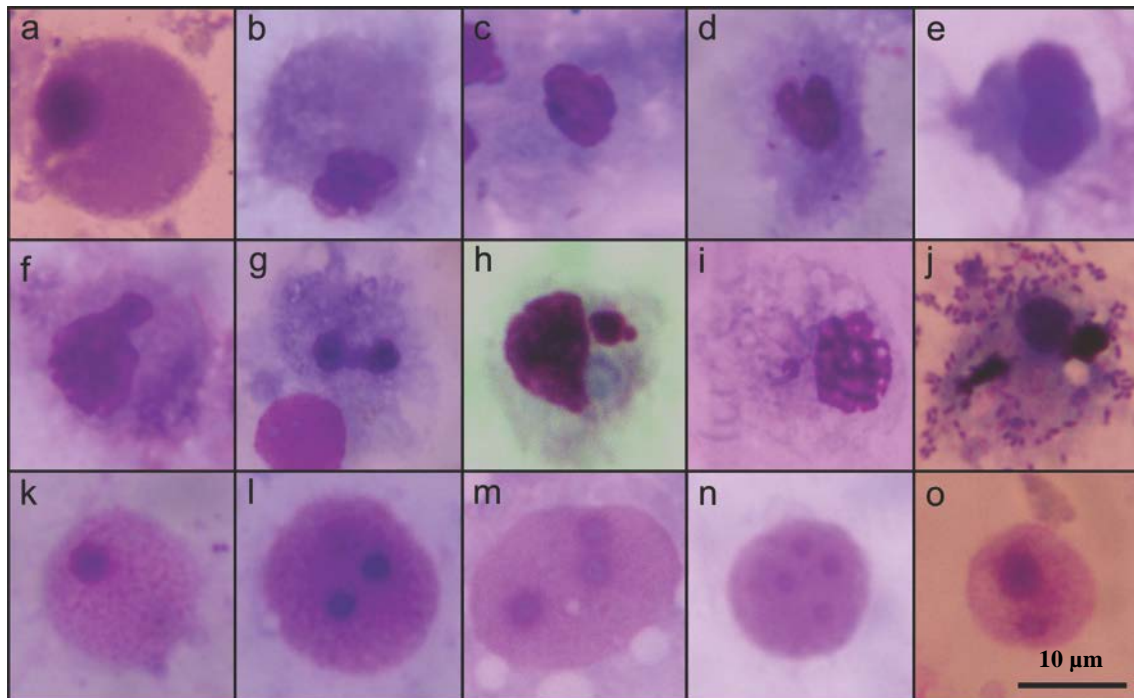


Figura 19. Células en extendidos de hemolinfa de *L. fortunei* luego de tratamientos con aguas del Río Paraná: a) granulocito normal; b) granulocito con núcleo lobulado; c) granulocito con núcleo globular; d) granulocito con núcleo en forma arriñonada; e) granulocito con núcleo en forma de ocho; f) granulocito con gemación nuclear; g) granulocito binucleado con puente de cromatina; h - i) granulocito con micronúcleo; j) granulocito rodeado de bacterias; k) hialinocito normal; l) hialinocito binucleado; m) hialinocito trinucleado; n) hialinocito tetranucleado; o) hialinocito con micronúcleo. Aumento: 1000X

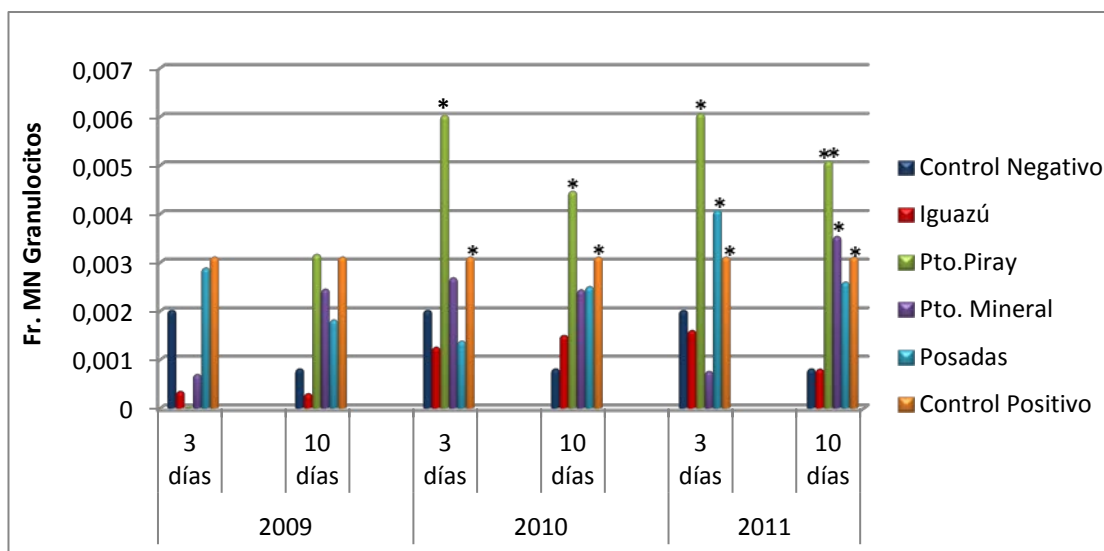


Figura 20. Frecuencias de MN en granulocitos de hemolinf de *L. fortunei* luego de 3 y 10 días de exposición a muestras de agua del Río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011. Diferencias significativas respecto al control negativo determinadas mediante Kruskal-Wallis: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

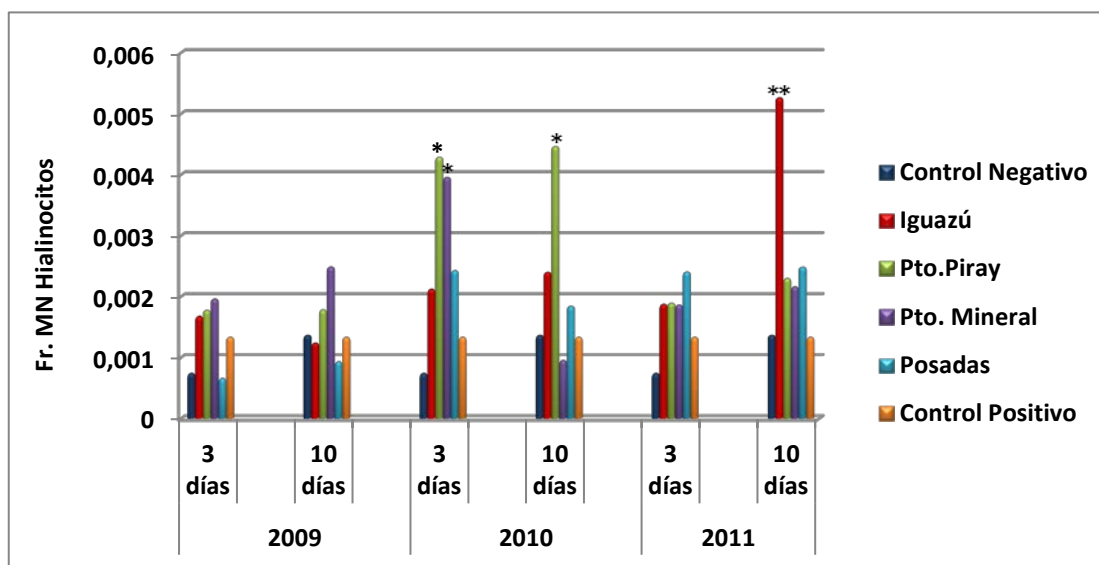


Figura 21. Frecuencias de MN en hialinocitos de hemolinf de *L. fortunei* luego de 3 y 10 días de exposición a muestras de agua del Río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011. Diferencias significativas respecto al control negativo determinadas mediante Kruskal-Wallis: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Entre las células constituyentes de la hemolinf, dentro del grupo denominado hialinocitos, se encontraron en amplia proporción células binucleadas y trinucleadas. Además, aunque en menor frecuencia, también se distinguieron otras células multinucleadas constituidas casi en su totalidad por la presencia de cuatro núcleos (figuras

19 l, m, n, y figura 22). Estos hialinocitos tetranucleados se vieron en prácticamente todos los tratamientos realizados para esta especie de mejillones y en los tres años de estudio.

La disminución en las frecuencias de las células multinucleadas de manera inversamente proporcional al incremento de las frecuencias de MN en el transcurso de los años, sólo fue evidente para sitios como Pto. Mineral. En tanto sitios como Posadas por ejemplo, mostraron incrementos secuenciales de dichas frecuencias.

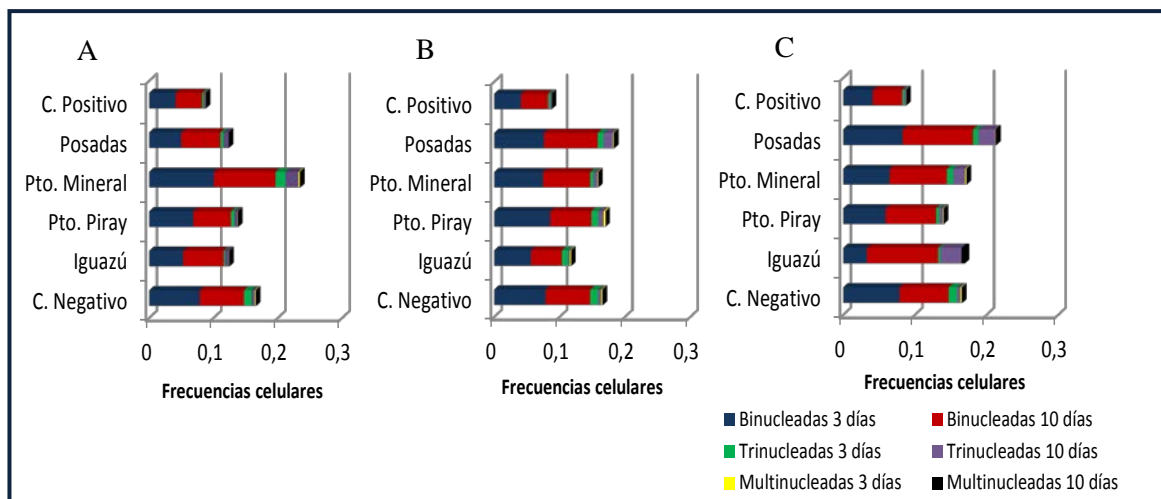


Figura 22. Frecuencias de hialinocitos binucleados, trinucleados y tetranucleados en *L. fortunei*, estimadas en función del total de hemocitos contabilizados por tratamiento con muestras de agua del río Paraná y controles luego de tres y diez días de exposición durante los años 2009 (A), 2010 (B) y 2011 (C).

Las AMN encontradas en los granulocitos de *L. fortunei* reflejaron frecuencias más elevadas al décimo día de exposición principalmente en los dos últimos años del estudio. De hecho, se hallaron valores estadísticamente superiores en relación al control negativo prácticamente para todos los sitios de muestreo (figura 23).

Durante los años 2010 y 2011 donde los valores de los ICA se redujeron gradualmente, se pudo observar un incremento en las frecuencias de AMN al ser contrastadas con las obtenidas en el año 2009.

En los bioensayos conducidos por tres días durante estos dos últimos años, Pto. Piray fue el único sitio que alcanzó junto al control positivo diferencias significativas respecto al control negativo ($p < 0,05$). Sin embargo, cabe señalar que las frecuencias de AMN en el control negativo para este tiempo de exposición fueron elevadas y a su vez, manifestaron una notable reducción al alcanzar el día diez de exposición ($p < 0,05$), tal como ocurrió con las frecuencias de MN para esta subpoblación celular.

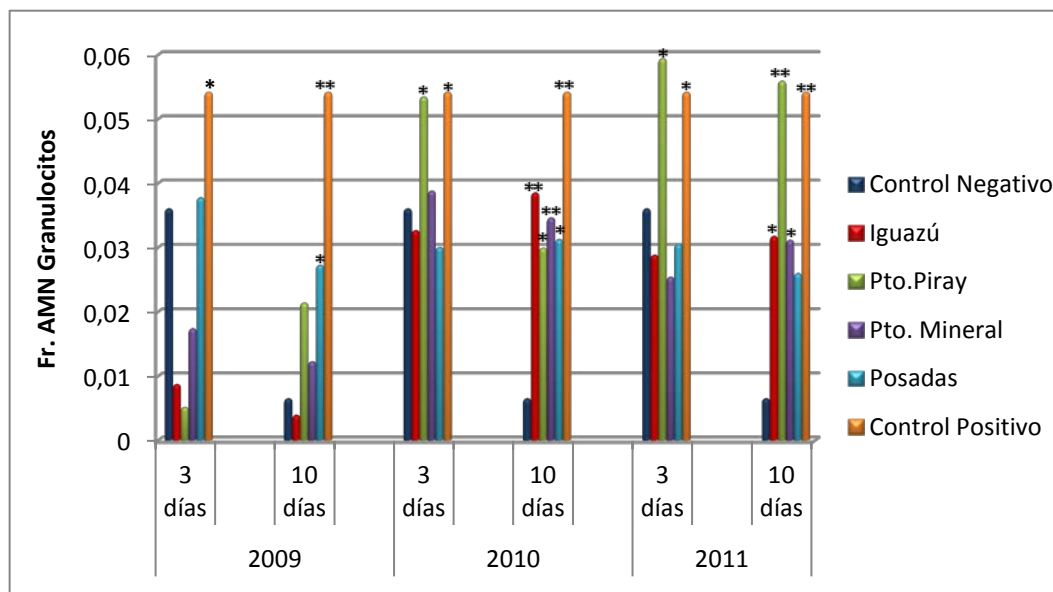


Figura 23. Frecuencias de Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en granulocitos de *L. fortunei* expuestos durante 3 y 10 días a muestras de agua del Río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011. Diferencias significativas respecto al control negativo determinadas mediante Kruskal-Wallis: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Entre los distintos tipos de AMN diferenciados en los granulocitos, tal como fue establecido para *C. fluminea*, los núcleos de tipo lobulados y los núcleos con gemaciones constituyeron las alteraciones más frecuentes halladas a partir de los extendidos de hemolinfa de *L. fortunei* para todos los tratamientos y controles, tanto al tercer como décimo día de exposición en todos los años de estudio (figura 24).

De acuerdo a los resultados obtenidos para esta especie de bivalvos, se observaron incrementos del daño genotóxico en respuesta a los tratamientos con muestras de agua del Río Paraná cuya condición fue de menor calidad según los valores de los ICA estimados. Dichas respuestas fueron más evidentes durante los años 2010 y 2011, tanto para el ensayo cometa como de MN y AMN.

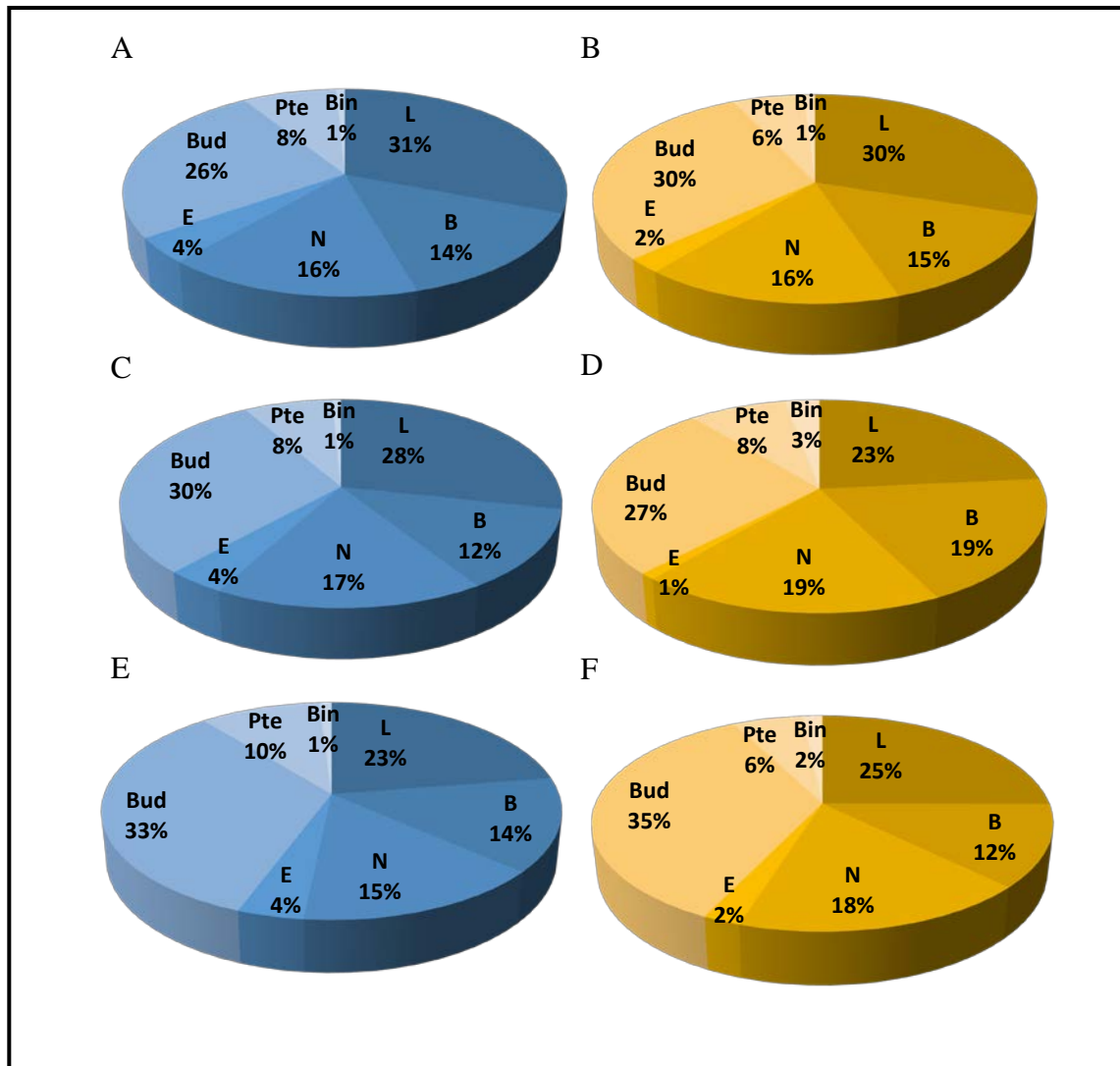


Figura 24. Porcentajes de distribución de los tipos de AMN encontradas en granulocitos de hemolinfa de *L. fortunei* luego de tres días de exposición (columna izquierda en color azul) y diez días de exposición (columna derecha en color amarillo) a los tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante los años 2009 (A y B), 2010 (C y D) y 2011 (E y F). L: *Lobed*; B: *Blebbed*; N: *Notched*; E: *Eightshaped*; Bud: Gemaciones; Pte.: Puentes cromatínicos; Bin: células binucleadas.

***Steindachnerina brevipinna* (Eigenmann & Eigenmann, 1889)**

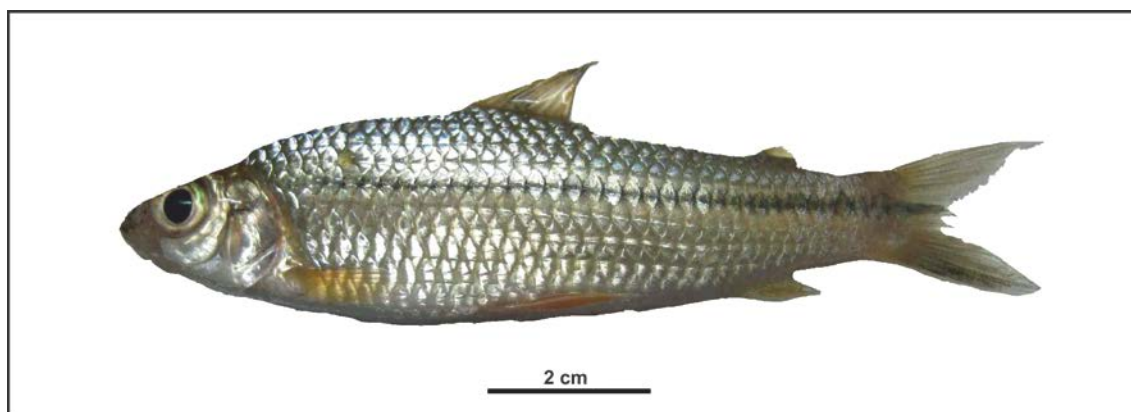


Figura 25. Vista lateral de ejemplar de *Steindachnerina brevipinna*.

La longitud estándar media de los 132 ejemplares de *Steindachnerina brevipinna* (figura 25) analizados durante los tres años de estudio, se presentan en la tabla VII.

Tabla VII: Longitud media de los 145 ejemplares de *S.brevipinna* empleados durante todo el periodo de estudio (2009-2011) expresado como Media \pm Desvío Estándar (M \pm DE)

Tratamientos	<i>S. brevipinna</i> (M \pm DE)
C. Negativo	9,22 \pm 1,28
Iguazu	8,80 \pm 2,10
Pto. Piray	8,63 \pm 1,67
Pto. Mineral	9,23 \pm 2,24
Posadas	9,23 \pm 2,13
C. Positivo	8,40 \pm 1,29

Durante los bioensayos realizados en el transcurso del año 2010, se observó una mortalidad de 10 de los 41 ejemplares de peces expuestos. La proporción de mortalidad dependió de los sitios de muestreo y tiempos de exposición, de la siguiente manera: 50 % de mortalidad entre el quinto y sexto día de exposición a muestras de agua procedentes de Pto. Piray; 27 % de mortalidad entre el quinto y séptimo día de exposición a muestras de agua obtenidas a la altura de Pto. Mineral; y 20 % de mortalidad al octavo día de exposición a muestras de agua tomadas en la ciudad de Posadas.

Por otra parte, de los ensayos realizados durante el año 2011, se obtuvo un 100 % de mortalidad en los 8 ejemplares expuestos a muestras de agua de Posadas entre el segundo y quinto día de tratamiento. En este caso, sólo se pudieron analizar los frotis de sangre de cuatro individuos procesados post-mortem para establecer el recuento de MN y AMN. Los preparados destinados a ensayo cometa no dieron resultados.

ENSAYO COMETA:

Los valores de p derivados del test de Shapiro-Wilks aplicado a los datos originados a partir del ensayo cometa, estuvieron comprendidos entre 0,01 y 0,04 tanto al cabo de tres como diez días de exposición a los distintos tratamientos y controles. Debido a que dichos valores son considerados significativos para un intervalo de confianza del 95 % ($p < 0,05$), se determinó ausencia de distribución normal de los datos y los mismos fueron analizados estadísticamente mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

La viabilidad celular fue superior al 90 % para todos los tratamientos realizados.

Los resultados obtenidos de la aplicación del ensayo cometa mostraron índices más elevados de daño en el ADN de eritrocitos de *S. brevipinna* expuestas durante tres días a las muestras de agua provenientes de Pto. Piray y Pto. Mineral, con diferencias significativas respecto al control negativo ($p < 0,05$ – $p < 0,01$) para los tres años de estudio (figura 26).

Los mayores niveles de daño genotóxico al tercer día de exposición en estos sitios, se registraron durante el año 2010. Efectivamente, el mayor ID encontrado para esta especie, se observó al tercer día de exposición a las muestras de Pto. Piray, seguido por una mortalidad del 50 % de los ejemplares expuestos entre el quinto y sexto día a dichas muestras de agua.

En lo que respecta a los sitios restantes, la disminución progresiva en los valores de los ICA se vio reflejada en un incremento de los ID en el transcurso del año 2011, que alcanzó diferencias significativas respecto al control para el caso de Iguazú y coincidió con la mortalidad del total de peces expuestos oportunamente a las muestras de agua correspondientes a Posadas. En este mismo año se registraron a su vez los ID más pronunciados a los diez días de exposición para todas las muestras de agua (figura 27), a pesar de que sólo el sitio Pto. Piray presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo. Cabe destacar también que sólo los valores de ID obtenidos para Pto. Mineral disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) respecto a los ensayos realizados durante tres días de exposición.

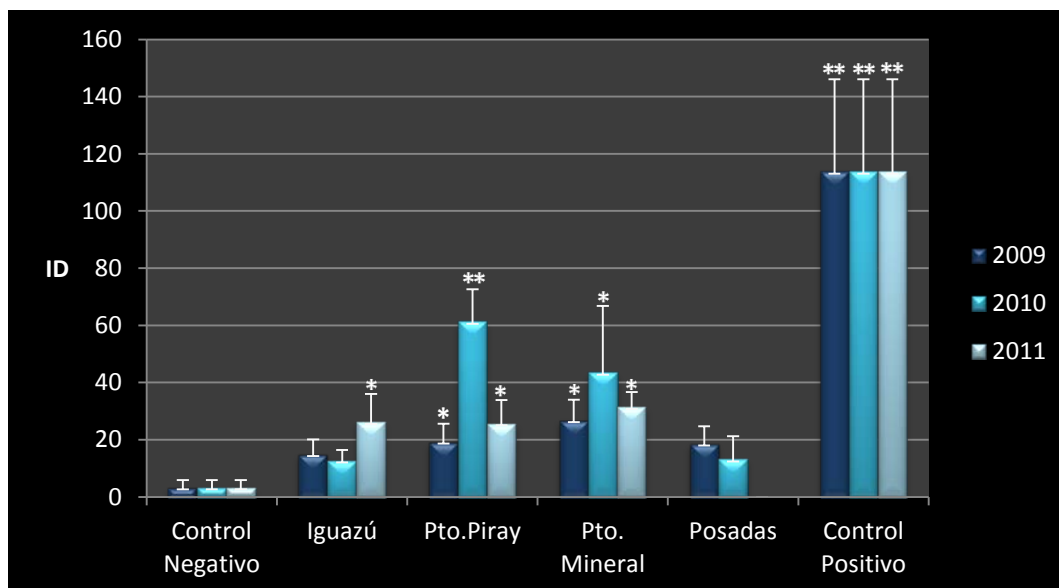


Figura 26. Índices medios de daño en el ADN ($ID \pm DE$) de eritrocitos de *S. brevipinna* detectados mediante Ensayo Cometa luego de tres días de exposición a muestras de agua del Río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011. Diferencias significativas respecto al control negativo determinadas mediante Kruskal-Wallis: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

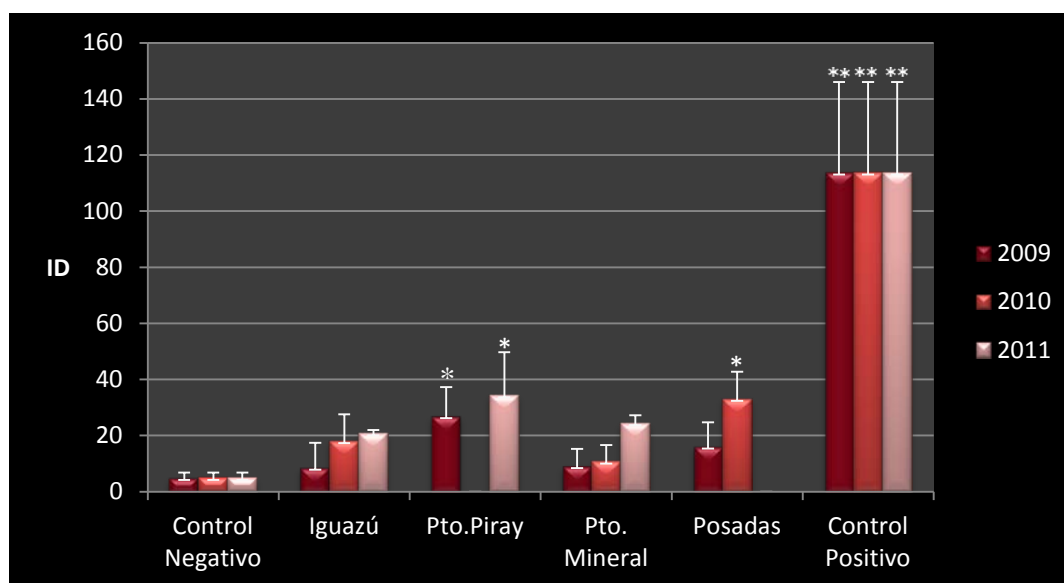


Figura 27. Índices medios de daño en el ADN ($ID \pm DE$) de eritrocitos de *S. brevipinna* detectados mediante Ensayo Cometa luego de diez días de exposición a muestras de agua del Río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011. Diferencias significativas respecto al control negativo determinadas mediante Kruskal-Wallis: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Del total de nucleoides examinados en cada individuo y por tratamiento, la mayor proporción se encontró en la categoría que representa ausencia de daño en el ADN, es

decir, cometas de clase 0 (ver anexo III, tablas XIII – XVIII). El promedio general de células dentro de esta clase fue del 83 %.

La principal categoría de cometas en las que se agruparon aquellas células que presentaron daño en su ADN, es decir el 17 % restante, se correspondió con la clase 1 (daño leve), seguido consecutivamente por cometas de clase 2, 3 y 4 (figura 28).

Asimismo, el mayor registro de daño en el ADN representado en cada una de clases de cometas respectivas, se obtuvo en los bioensayos conducidos con muestras de agua de Pto. Piray durante tres días en el año 2010.

En esta especie de peces, la respuesta de los eritrocitos ante el agente empleado en el control positivo (EMS) fue más pronunciada, igualándose el porcentaje total de células con daño (50 %) al de células sin daño (50 %).

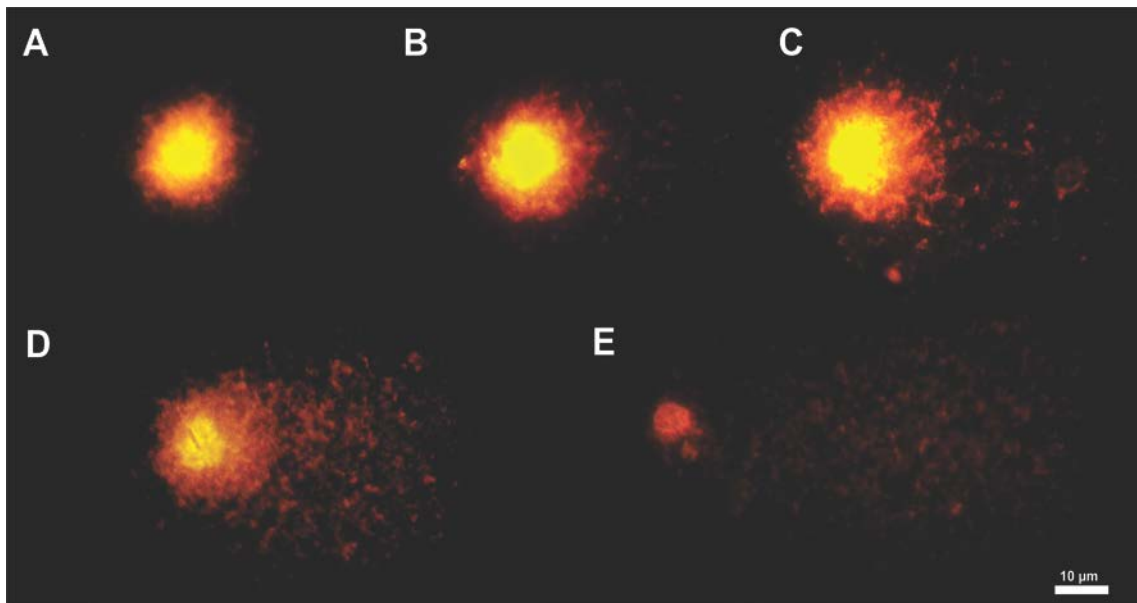


Figura 28. Lesiones en el ADN de células de hemolinfa de *S. brevipinna* detectadas mediante ensayo cometa luego de tratamientos con aguas del Río Paraná: A) clase 0; B) clase 1, C) clase 2; D) clase 3 y E) clase 4. Aumento: 1000X

TEST DE MICRONÚCLEOS (MN) Y ALTERACIONES DE LA MORFOLOGÍA NUCLEAR (AMN):

En todos los tratamientos realizados durante los años 2009, 2010 y 2011, el test de Shapiro-Wilks mostró diferencias significativas ($p < 0,0001$) respecto a una distribución normal de los datos obtenidos a partir del test de MN y AMN. Por ello, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para el análisis estadístico de los resultados derivados de estos ensayos.

Las frecuencias de MN más destacadas ($p < 0,01$) se dieron al tercer día de exposición a muestras de agua de Pto. Piray (0,0014) y Pto. Mineral (0,0009) en el año 2010; y para el sitio Posadas (0,00125) durante el año 2011 (figura 29). Superaron inclusive las frecuencias resultantes de los bioensayos correspondientes al control positivo. No se observaron núcleos apoptóticos para ningún tratamiento.

En general, las frecuencias de MN halladas al décimo día de exposición a las distintas muestras de agua, fueron de menor magnitud. Pto. Piray fue el único sitio en manifestar diferencias significativas respecto al control negativo en todos los años para este tiempo de ensayo, con excepción del 2010 en donde la mortalidad del 50 % de los ejemplares expuestos, no permitió la obtención de resultados (ver anexo IV, tablas XIII – XV).

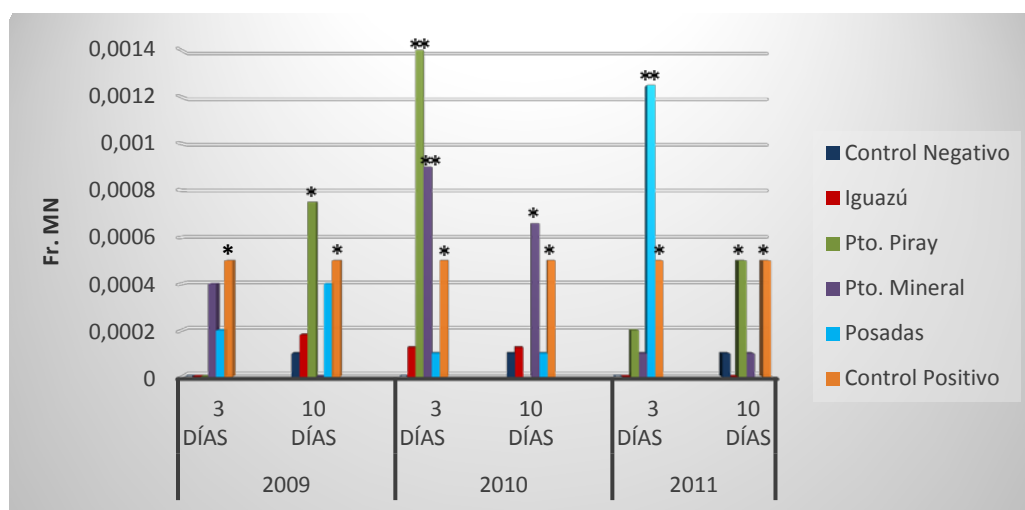


Figura 29. Frecuencias (Fr.) de Micronúcleos (MN) en eritrocitos de *S. brevipinna* expuestos durante tres y diez días a muestras de agua del Río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011. Diferencias significativas respecto al control negativo determinadas mediante Kruskal-Wallis: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Las frecuencias de AMN en las que se pudieron establecer diferencias significativas con relación a los controles, correspondieron a Pto. Piray y Pto. Mineral ($p < 0,01$) tanto al tercer como décimo día de exposición en el año 2010 (figura 30).

En cuanto a los bioensayos realizados con muestras de agua procedentes de Posadas e Iguazú, se registraron aumentos importantes en las frecuencias de AMN al décimo día, que contrastaron notablemente con las obtenidas al tercer día de exposición en los dos últimos años de estudio ($p < 0,01$).

En todos los casos restantes, las frecuencias se mantuvieron relativamente uniformes y no se observaron diferencias destacadas entre los controles negativo y positivo. De hecho, los sitios cuyas frecuencias se diferenciaron estadísticamente del control negativo también lo hicieron respecto al control positivo, superando entre cuatro a seis veces dichos valores.

Aunque menos pronunciadas, las frecuencias de AMN se incrementaron entre el tercer y décimo día de exposición para el control negativo, tal como se vio en las frecuencias de MN.

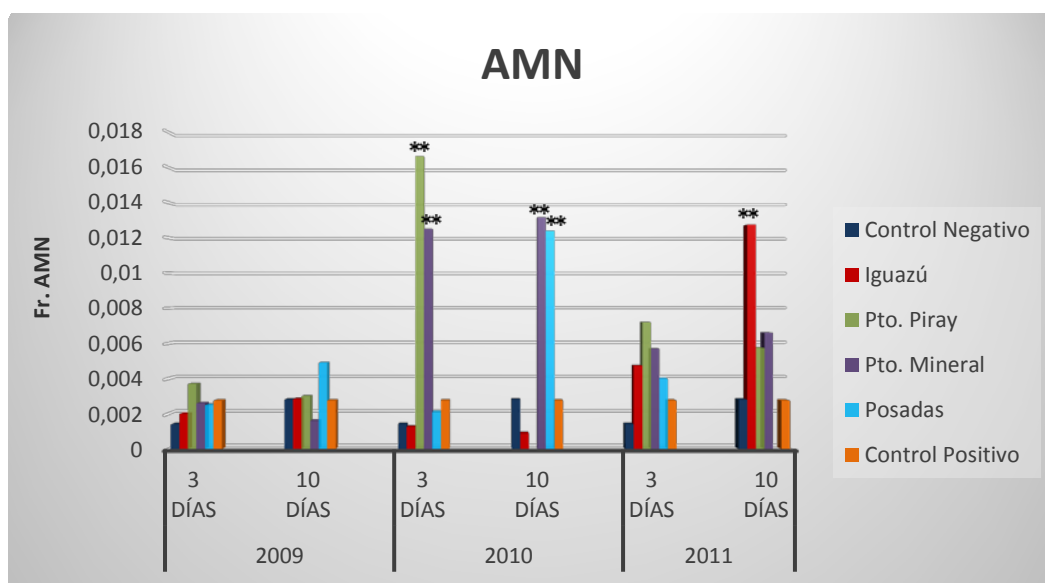


Figura 30. Frecuencias (Fr.) de Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en eritrocitos de *S. brevipinna* expuestos durante tres y diez días a muestras de agua del Río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011. Diferencias significativas respecto al control negativo determinadas mediante Kruskal-Wallis: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Los principales tipos de alteraciones encontradas en los núcleos de los eritrocitos de *S. brevipinna* fueron: gemaciones (*buds*) y núcleos lobulados o *lobed* (figuras 31 y 32 b, h,

i). Estas AMN en mayor proporción, coinciden con las halladas en los bivalvos. Sin embargo, a diferencia de los mismos, no siempre se observaron ambos tipo de alteraciones como predominantes en todos los tratamientos. En algunos casos, tal como puede observarse en la figura 30 A, B, E y F, siguiendo a los porcentajes más elevados de núcleos con gemaciones o lobulados, también se destacaron los núcleos globulares (*blebbed*) y con muescas en forma arriñonada (*notched*).

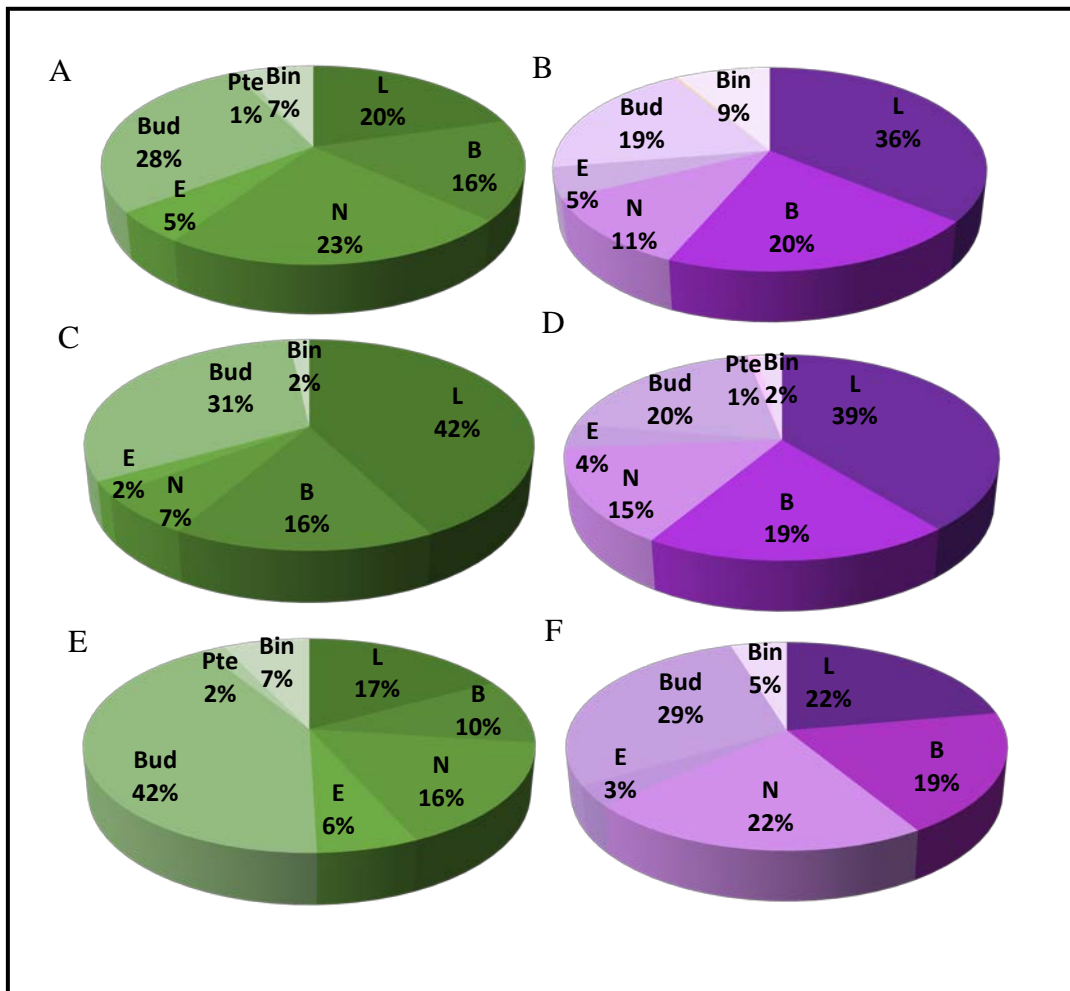


Figura 31. Porcentajes de distribución de los tipos de AMN encontradas en eritrocitos de *S. brevipinna* luego de tres días de exposición (columna izquierda en color verde) y diez días de exposición (columna derecha en color violeta) a los tratamientos con muestras de agua del Río Paraná y controles durante los años 2009 (A y B), 2010 (C y D) y 2011 (E y F). L: *Lobed*; B: *Blebbed*; N: *Notched*; E: *Eightshaped*; Bud: Gemaciones; Pte.: Puentes cromatínicos; Bin: células binucleadas.

Los resultados de los bioensayos de genotoxicidad en *S. brevipinna* muestran mayor daño en el ADN de eritrocitos expuestos a muestras de agua de Pto. Piray,

Pto. Mineral y Posadas, citados en orden de mayor a menor impacto, tanto para el ensayo cometa como para el test de MN y AMN.

En los años 2010 y 2011 se registraron los valores más elevados de daño genotóxico para ambos ensayos, al mismo tiempo que la calidad de las muestras de agua se vio disminuida en función de los ICA estimados.

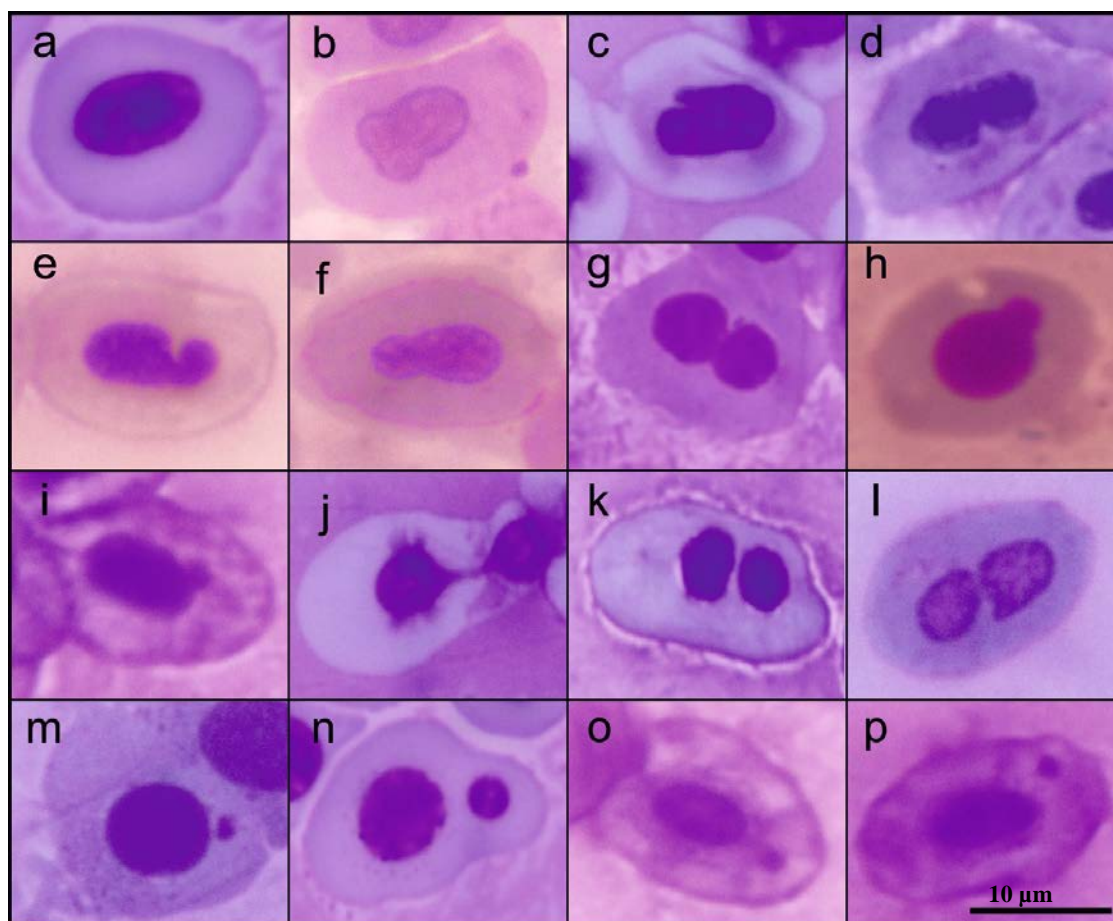


Figura 32. Alteraciones nucleares obtenidas mediante el test de MN y AMN en eritrocitos de *S. brevipinna* luego de la exposición con aguas del Río Paraná: a) eritrocito normal; b) núcleo lobulado; c) núcleo globular; d - e) núcleo en forma arriñonada; f - g) núcleo en forma de ocho; h - i) gemaciones nucleares; j) puente cromatínico; k - l) eritrocitos binucleados; m - p) eritrocitos con micronúcleos. Aumento: 1000X.

EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OCASIONADO POR LA MANIPULACIÓN DE LOS INDIVIDUOS:

El análisis del posible estrés generado por la manipulación y el sometimiento de los ejemplares a repetidas extracciones de muestras biológicas (hemolinfa y sangre, respectivamente) fue evaluado al décimo día de exposición para los tres modelos biológicos seleccionados como bioindicadores y para cada ensayo genotóxico por separado. Los mismos fueron efectuados para aquellos sitios de muestreo donde fue posible mantener vivos a los ejemplares luego de ser procesados al tercer día de exposición.

Debido a que los bivalvos por su pequeño tamaño resultaron más frágiles ante la extracción de muestras de hemolinfa que fueran suficientes para la aplicación de ambos ensayos (cometa, MN y AMN), la mayoría de ellos debieron ser sacrificados y sólo fue posible realizar el análisis de estrés en un único sitio (Pto. Mineral) tanto en *C. fluminea* (N=3 ejemplares) durante el periodo 2011 como en *L. fortunei* (N=3 ejemplares) durante el 2009.

En cuanto a los peces, fue posible llevar a cabo este análisis en todos los sitios de muestreo aunque en diferentes años, a causa de la disponibilidad de ejemplares capturados (N= 3 – 5 ejemplares por tratamiento). Así, los datos de Iguazú corresponden a los bioensayos desarrollados en el año 2009; los datos de Pto. Piray al 2011; los de Pto. Mineral al 2009 y finalmente los pertenecientes a Posadas, al año 2010. Esto posibilitó, a su vez, tener muestras de referencia para cada sitio y año de estudio.

ENSAYO COMETA:

La comparación de los resultados obtenidos entre los tratamientos que incluyeron sólo individuos cuyas muestras fueron tomadas al décimo día de exposición y aquellos sometidos al mismo tratamiento previa extracción de material biológico al tercer día de exposición (figuras 33 y 34), no mostraron diferencias significativas entre sí para ninguna de las especies en estudio.

Las pruebas estadísticas aplicadas fueron las correspondientes al ensayo cometa para cada especie, tal como se detalló a lo largo del apartado. Los valores de p fueron de 0,57 para *C. fluminea*; 0,55 para *L. fortunei* y para *S. brevipinna* oscilaron entre $p = 0,47$ y $p > 0,99$.

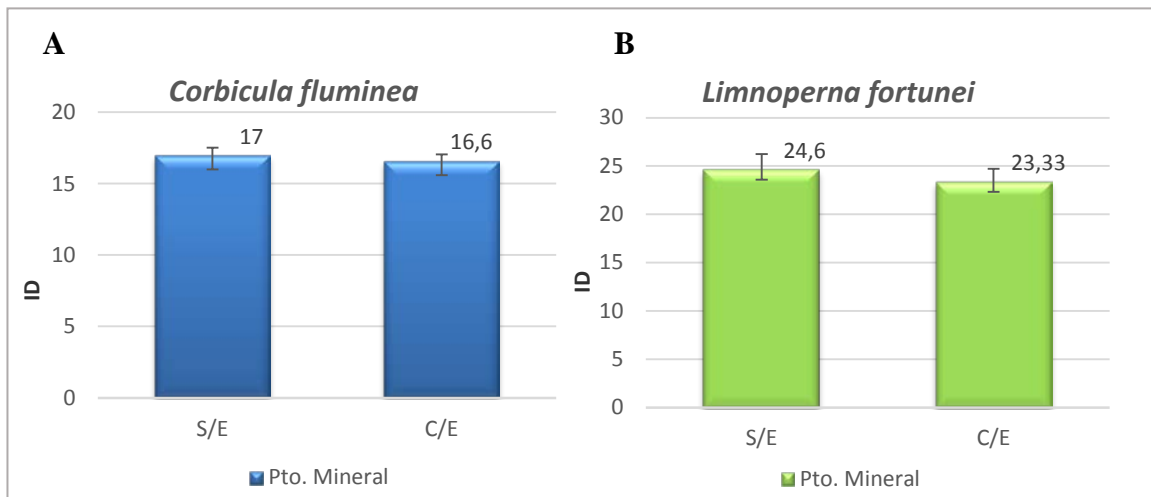


Figura 33. Evaluación del estrés generado por repetidas extracciones de hemolinfa en el análisis de índices de daño en el ADN (ID) luego de la aplicación del ensayo cometa al décimo día de exposición a muestras de agua de Puerto Mineral, mediante la comparación de individuos de *C. fluminea* y *L. fortunei* sometidos a una única extracción al décimo día (S/E) y a extracciones repetidas al tercer y décimo día de exposición (C/E).

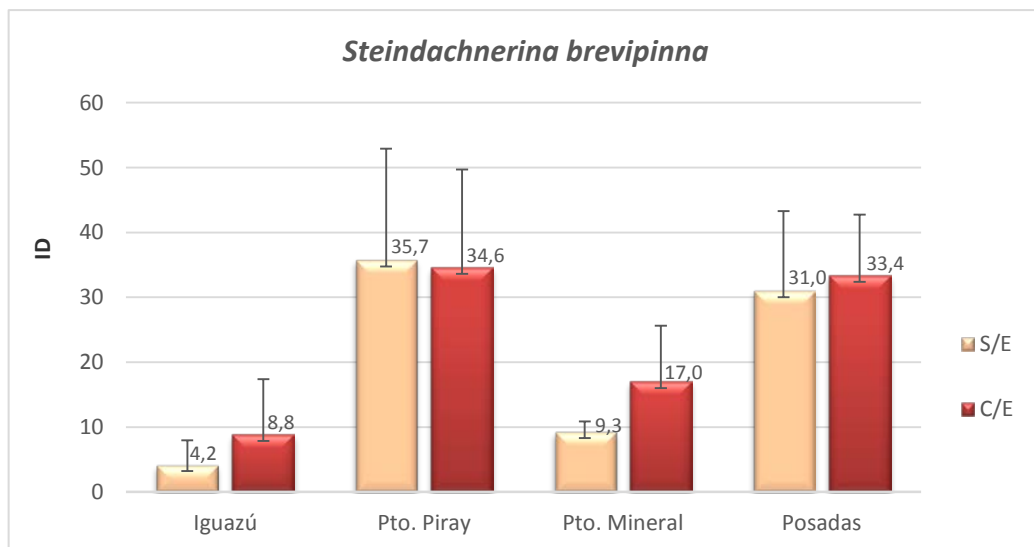


Figura 34. Evaluación del estrés generado por repetidas extracciones de sangre en el análisis de índices de daño en el ADN (ID) luego de la aplicación del ensayo cometa al décimo día de exposición a muestras de agua del Río Paraná, mediante la comparación de individuos de *S. brevipinna* sometidos a una única extracción al décimo día (S/E) y a extracciones repetidas al tercer y décimo día de exposición (C/E).

TEST DE MICRONÚCLEOS Y ALTERACIONES DE LA MORFOLOGÍA NUCLEAR:

Similar a lo observado para ensayo cometa, los análisis estadísticos aplicados a las frecuencias de MN y AMN no mostraron diferencias significativas entre los bioensayos con individuos cuyas muestras biológicas fueron extraídas una única vez al décimo día de exposición, y aquellos que fueron sometidos a extracciones previas al tercer día de exposición.

En el caso de los bivalvos, el análisis se llevó a cabo discriminando los tipos celulares de la hemolinfa (figura 35). Así, el valor de p para las frecuencias de MN en granulocitos fue de 0,87 en *C. fluminea* y de 0,82 en *L. fortunei*. En cuanto a los hialinocitos, se obtuvieron valores de $p > 0,99$ para ambas especies.

Por otra parte, la comparación de las frecuencias de AMN en granulocitos arrojó valores de $p= 0,89$ para las almejas y valores de $p= 0,97$ para los mejillones.

La evaluación de estrés en los peces se realizó para todos los sitios de muestreo (figura 36), obteniéndose valores de p comprendidos entre 0,83 y $p > 0,99$ al comparar las frecuencias de MN y valores de p entre 0,46 y 0,97 para las respectivas frecuencias de AMN.

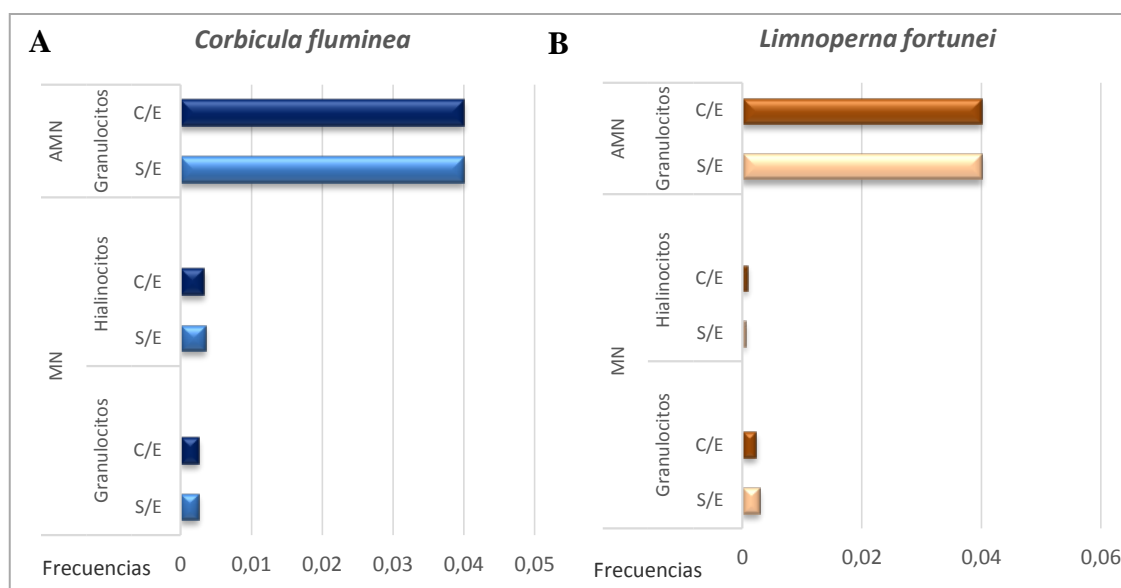


Figura 35. Evaluación del estrés generado por repetidas extracciones de hemolinfa mediante la comparación de frecuencias de micronúcleos (MN) y alteraciones de la morfología nuclear (AMN) en hialinocitos y granulocitos de *C. fluminea* (A) y *L. fortunei* (B) sometidos a una única extracción al décimo día (S/E) y a extracciones repetidas al tercer y décimo día de exposición (C/E) a muestras de agua de Puerto Mineral.

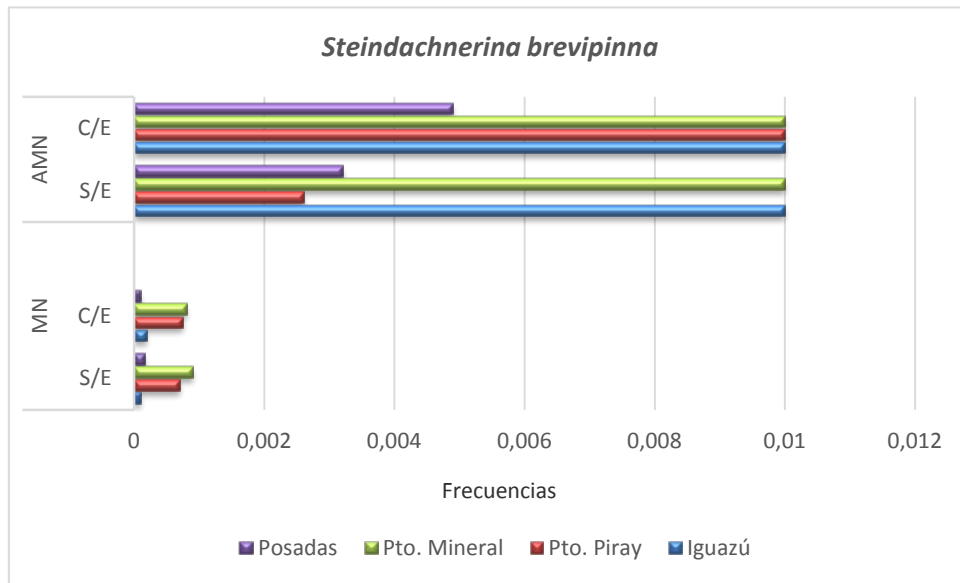


Figura 36. Evaluación del estrés generado por repetidas extracciones de sangre en *S. brevipinna* mediante la comparación de frecuencias de micronúcleos (MN) y alteraciones de la morfología nuclear (AMN) de individuos sometidos a una única extracción al décimo día (S/E) y a extracciones repetidas al tercer y décimo día de exposición (C/E) a muestras de agua del Río Paraná.

Se pudo apreciar que no existieron variaciones en cuanto a las frecuencias de MN entre ambos grupos de comparación para ninguna de las tres especies bajo estudio.

Sin embargo, en el grupo de *S. brevipinna* sometido a repetidas extracciones de sangre luego de la exposición a los sitios Iguazú y Pto. Piray, se registró un número mayor de células con núcleos lobulados (*lobed*), globulares (*blebbed*) y con forma arriñonada (*notched*), responsables de las mayores frecuencias de AMN encontradas en estos casos. En ellos, la proporción de eritrocitos inmaduros (eritroblastos) encontrados en los frotis sanguíneos fue superior a la observada en el grupo cuyas muestras de sangre fueron tomadas una única vez al décimo día de ensayo.

Debido a que las pruebas estadísticas no consideraron estas diferencias como significativas para un intervalo de confianza del 95 %, los individuos sujetos a repetidos tratamientos para un mismo sitio (tres y diez días de exposición) fueron incorporados al estudio, incrementando así el tamaño de muestra.

SECCIÓN III

ENSAYOS DE RECUPERACIÓN DE DAÑOS

Los ensayos de recuperación de daños se establecieron para las tres especies involucradas en los ensayos *in vivo*, luego de la exposición tanto de tres como diez días a tratamientos con muestras de agua procedentes de Puerto Piray y Puerto Mineral durante el transcurso del año 2011. Los resultados obtenidos luego de la aplicación de los ensayos cometa, de MN y AMN se presentan a continuación:

ENSAYO COMETA:

Los resultados obtenidos con esta técnica mostraron una respuesta positiva ante los ensayos de recuperación de daños en el ADN en función del tiempo para los tres modelos biológicos. La reversión de dichos daños fue más acentuada en los individuos provenientes de los tratamientos con aguas de Pto. Piray.

La especie de bivalvos *C. fluminea* presentó una reducción progresiva del índice de daños en el ADN (ID) de sus hemocitos luego de los ensayos de recuperación de 5 y 10 días para ambos tratamientos (figura 37).

En el caso de *L. fortunei*, la disminución de dichos índices se observó principalmente al alcanzar el décimo día de recuperación (figura 38).

En cuanto a los peces de la especie *S. brevipinna*, también se puso de manifiesto una reducción gradual del daño genotóxico a los 5, 10 y 15 días de recuperación en los organismos expuestos previamente a tratamientos con aguas de Pto. Piray y Pto. Mineral (figura 39). Estadísticamente, aquellos organismos que alcanzaron un periodo de recuperación de quince días, fueron los únicos en manifestar una disminución significativa de los ID ($p=0,024$) respecto al tratamiento.

Los valores de los índices de daño en el ADN obtenidos para cada tiempo de recuperación, así como el total de células analizadas en cada uno de ellos, se presentan en el anexo III, tablas XIX – XXIV.

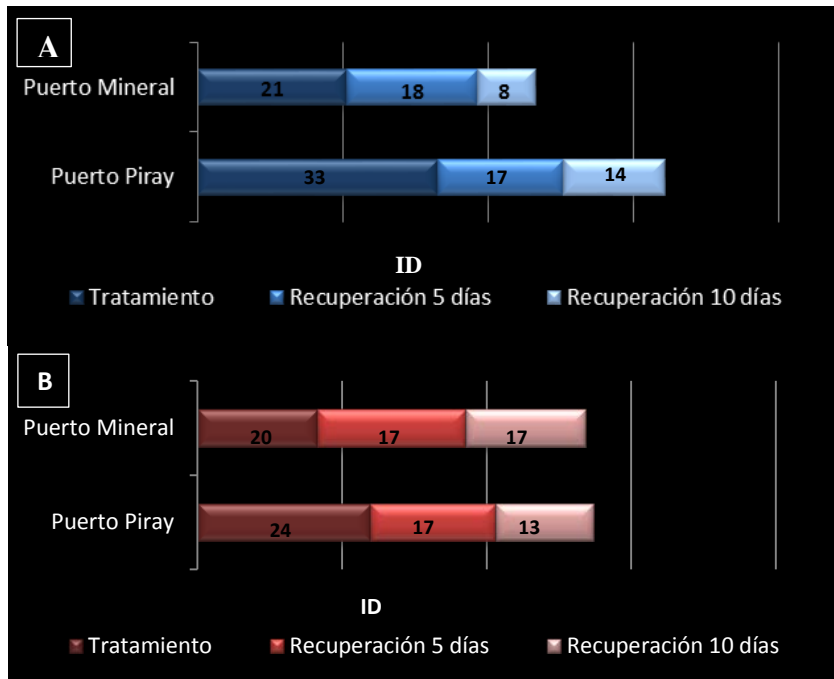


Figura 37. Ensayos de recuperación de daños en el ADN de hemocitos de *C. fluminea* previamente expuestos durante 3 días (A) y 10 días (B) a muestras de agua del Río Paraná durante el año 2011, evaluados mediante ensayo cometa y expresados como Índices de daño (ID) en el ADN.

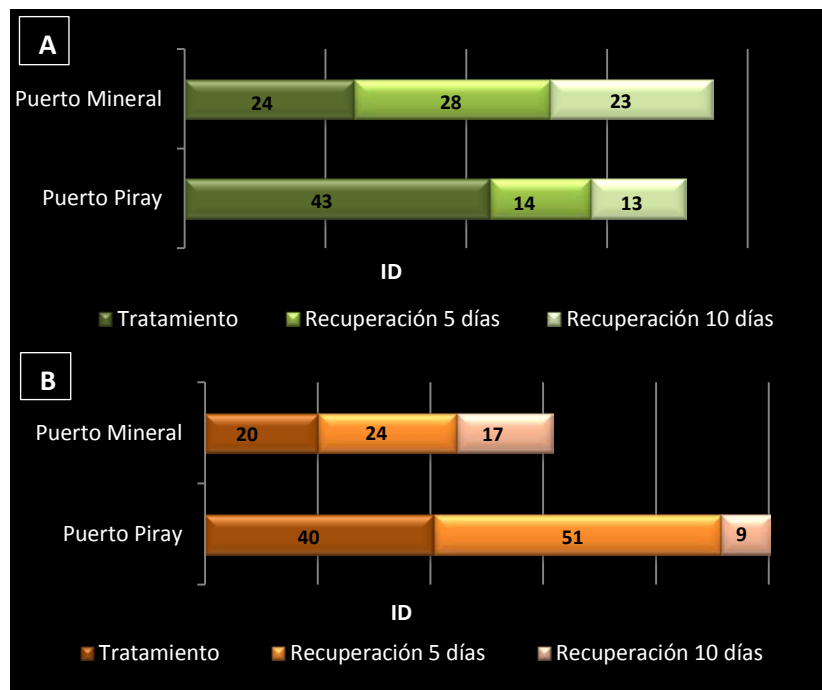


Figura 38. Ensayos de recuperación de daños en el ADN de hemocitos de *L. fortunei* previamente expuestos durante 3 días (A) y 10 días (B) a muestras de agua del Río Paraná durante el año 2011, evaluados mediante ensayo cometa y expresados como Índices de daño (ID) en el ADN.

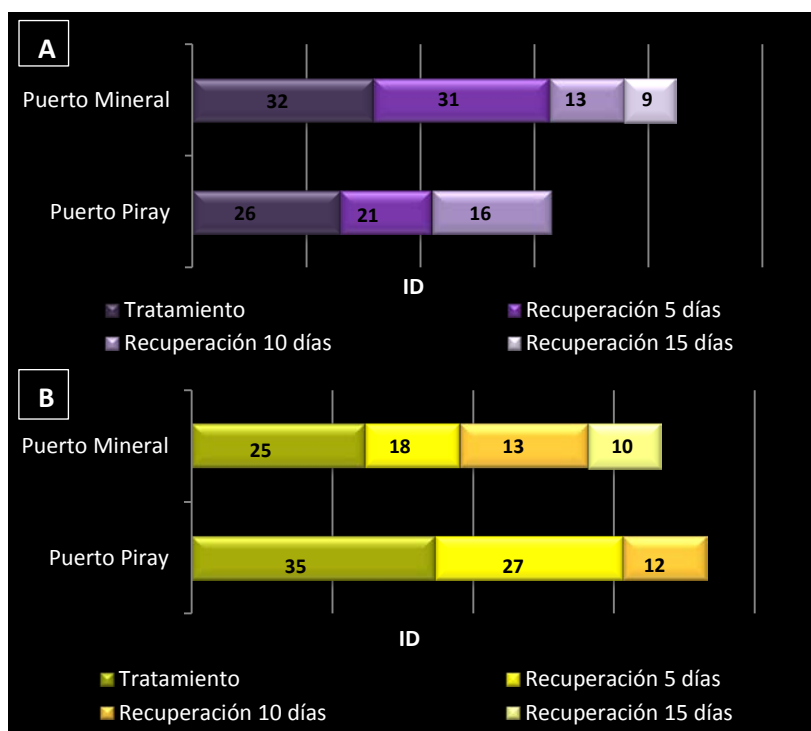


Figura 39. Ensayos de recuperación de daños en el ADN de eritrocitos de *S. brevipinna* previamente expuestos durante 3 días (A) y 10 días (B) a muestras de agua del Río Paraná durante el año 2011, evaluados mediante ensayo cometa y expresados como Índices de daño (ID) en el ADN.

Considerando por último el porcentaje de reducción de los índices de daño en el ADN no sólo en relación al tratamiento propiamente dicho, sino también en función del control negativo, los resultados se presentan en la tabla VIII de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ Reducción ID} = \frac{\text{ID tratamiento} - \text{ID recuperación}}{\text{ID tratamiento} - \text{ID control negativo}}$$

En este caso, la reducción de los ID se calculó para el máximo tiempo de recuperación al que fueron expuestos los ejemplares de cada especie, es decir 10 o 15 días, tal como se especificó anteriormente. Puede observarse que si bien en la mayoría de los casos hubo reducción de los ID, en ninguno de ellos se retornó a los valores basales de daño en el ADN representados por el control negativo. Dicha situación se puso de manifiesto debido a la ausencia de valores enteros derivados de la razón entre los ID de los ensayos de recuperación y los controles negativos, respectivamente. Los mayores porcentajes de reducción de daño para el tratamiento con aguas de Pto. Piray se obtuvieron

al décimo día de recuperación posterior a la exposición subcrónica de diez días en todas las especies; en tanto para Pto. Mineral la máxima reversión del daño en el ADN se obtuvo al décimo quinto día de recuperación posterior al tratamiento agudo de tres días, con la única excepción de *L. fortunei*.

Tabla VIII: Porcentajes de reducción en los índices de daño en el ADN (% ID) detectados mediante ensayo cometa luego de ensayos de recuperación posteriores a tratamientos con aguas del Río Paraná durante 3 y 10 días de exposición.

	% Reducción ID*			
	Tratamiento 3 días		Tratamiento 10 días	
	Pto. Piray	Pto. Mineral	Pto. Piray	Pto. Mineral
<i>C. fluminea</i>	0,71	0,88	0,77	0,00
<i>L. fortunei</i>	0,83	0,07	0,96	0,25
<i>S. brevipinna</i>	0,22	0,81	0,77	0,74

* % Reducción ID= ID tratamiento – ID recuperación / ID tratamiento – ID control negativo.

TEST DE MICRONÚCLEOS (MN) Y ALTERACIONES DE LA MORFOLOGÍA NUCLEAR (AMN):

En los bivalvos, la aplicación del test de MN y AMN en la evaluación de recuperación de daños en el ADN, se realizó paralelamente en los dos tipos celulares de la hemolinfa (hialinocitos y granulocitos).

La disminución gradual en el número de MN y de alteraciones nucleares en la especie *C. fluminea*, fue más precisa para los ensayos de recuperación llevados a cabo con ejemplares sometidos previamente a tratamientos agudos. Dicha respuesta se manifestó en las dos subpoblaciones celulares de la hemolinfa (figuras 40 y 41).

C. fluminea fue la única especie en la que se observaron reducciones significativas en las frecuencias de MN y AMN de los granulocitos al quinto día de recuperación, respecto al tratamiento con muestras de agua de Pto. Piray ($p < 0,05$).

Los núcleos lobulares, con muescas y con gemaciones se encontraron entre las alteraciones nucleares más frecuentes.

El detalle de las frecuencias y número total de cada tipo celular analizado, se presenta en el anexo IV, tablas XVI – XIX.

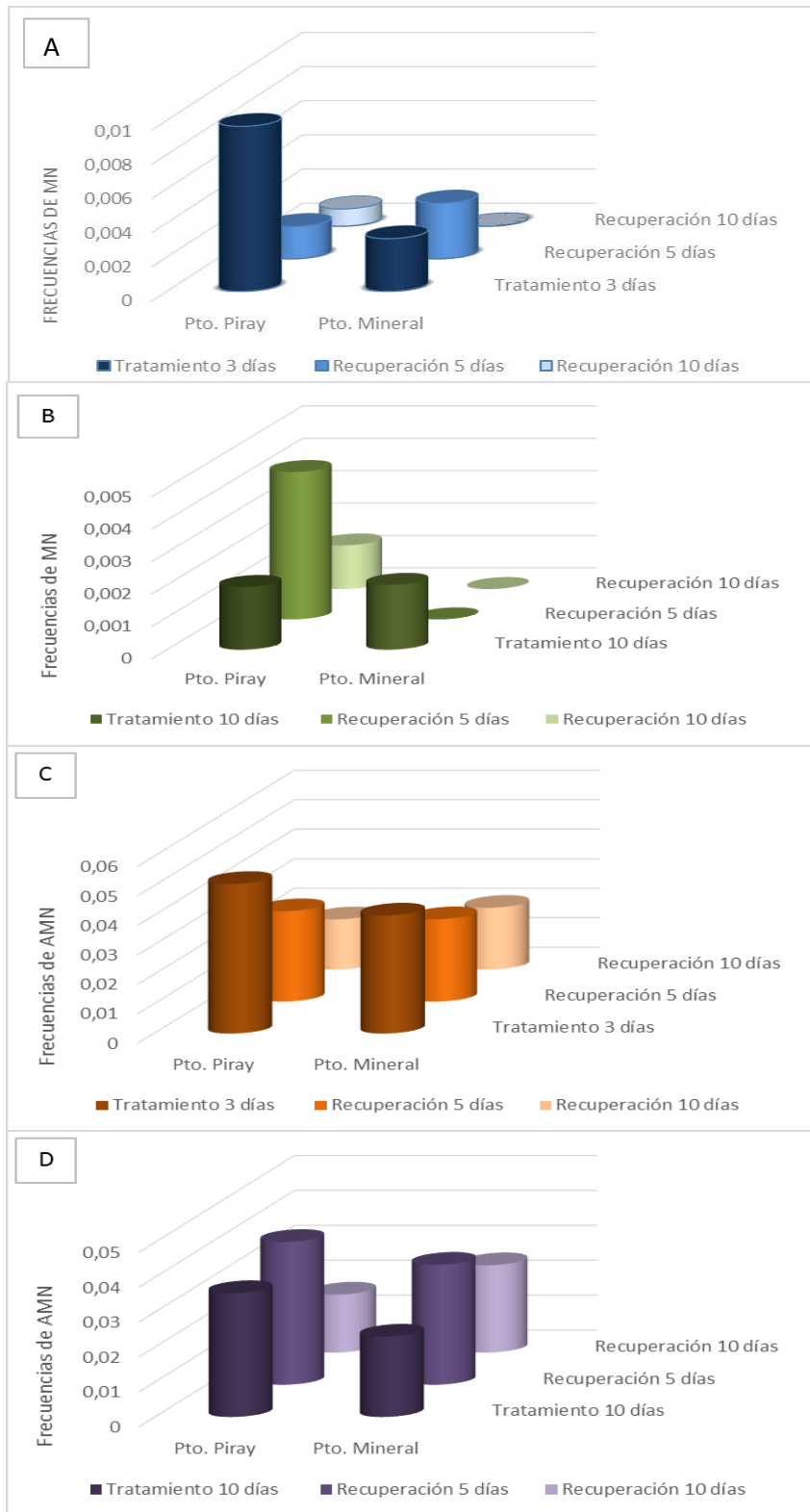


Figura 40. Ensayos de recuperación de daños en el ADN de granulocitos de *C. fluminea* luego de bioensayos de tres y diez días de exposición a muestras de agua del Río Paraná durante el año 2011, evaluados mediante test de Micronúcleos. A y B: expresados como frecuencias de Micronúcleos (MN); C y D: expresados como Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN).

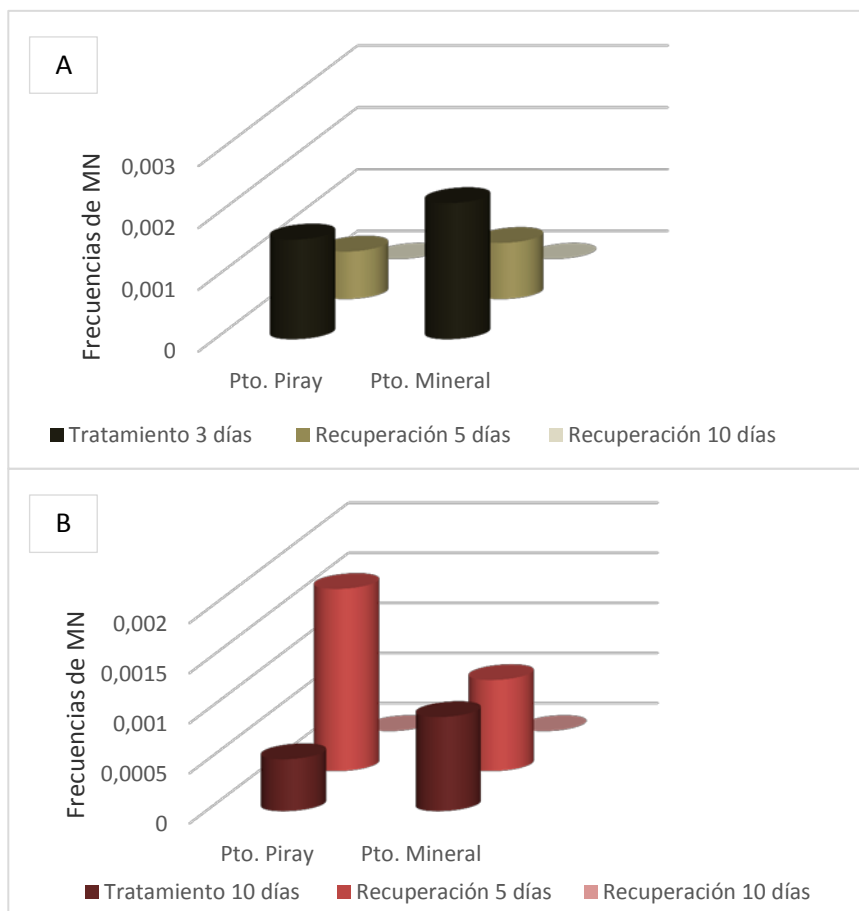


Figura 41. Ensayos de recuperación de daños en el ADN de hialinocitos de *C. fluminea* luego de bioensayos de tres días (A) y diez días (B) de exposición a muestras de agua del Río Paraná durante el año 2011, expresados como frecuencias de Micronúcleos (MN)

En cuanto al porcentaje de hialinocitos multinucleados, se apreciaron diferencias entre los tratamientos agudos al quinto día de recuperación (figura 42). Así, mientras que para Pto. Piray se advirtió un incremento de aproximadamente el doble en el número de hialinocitos binucleados y trinucleados, para Pto. Mineral éstos mostraron una marcada reducción.

Posteriormente, las frecuencias de estos hialinocitos al décimo día de recuperación tanto de los tratamientos agudos como subcrónicos, disminuyeron visiblemente.

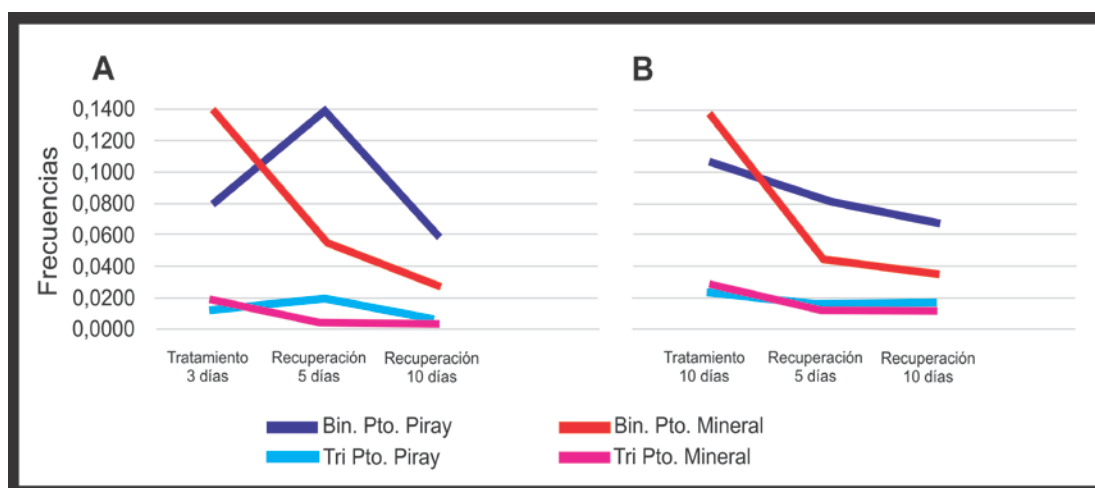


Figura 42. Frecuencias de hialinocitos binucleados (Bin) y trinucleados (Tri) en hemolinfa de *C. fluminea* luego de ensayos de recuperación de daños en el ADN para tratamientos con muestras de agua del Río Paraná: A) luego de tratamientos de 3 días y B) luego de tratamientos de 10 días con aguas de Pto. Piray y Pto. Mineral.

En la especie *L. fortunei*, la respuesta general ante los ensayos de recuperación fue positiva, obteniéndose una reducción máxima de los MN con frecuencias iguales a 0 para casi la totalidad de los tratamientos y tipos celulares. Las AMN, por su parte, manifestaron una reducción en sus frecuencias de hasta tres veces para los granulocitos y de hasta cuatro veces para los hialinocitos (figuras 43 y 44).

La respuesta ante los tiempos de recuperación evaluados fue similar en ambas subpoblaciones celulares.

Las alteraciones de la morfología nuclear del tipo lobulares y gemaciones fueron nuevamente las más numerosas encontradas en estos ensayos.

Los valores de las frecuencias respectivas de MN y AMN para cada tiempo de recuperación y tipo celular; así como el total de células analizadas en cada caso, se detallan en el anexo IV, tablas XX – XXIII.

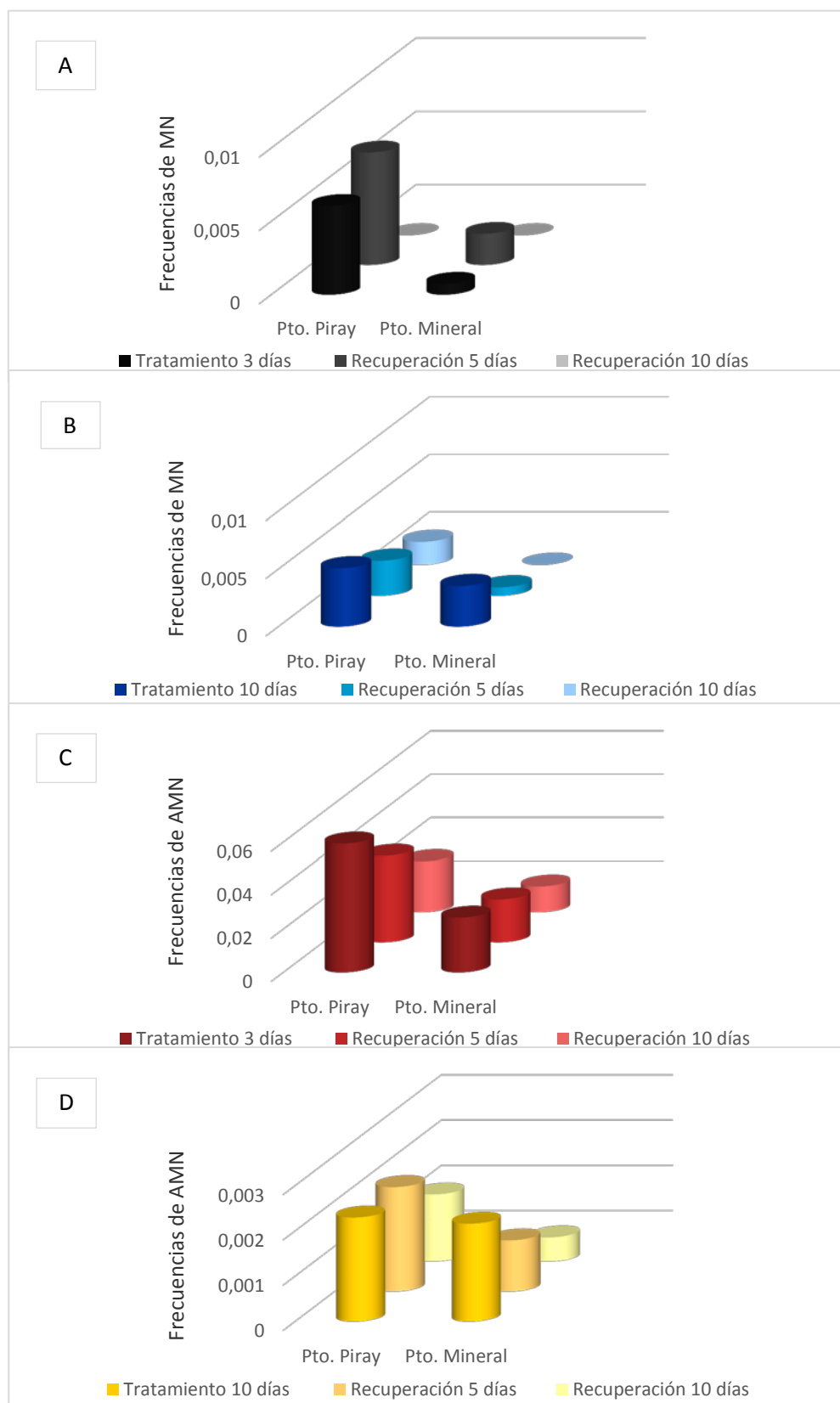


Figura 43. Ensayos de recuperación de daños en el ADN de granulocitos de *L. fortunei* luego de bioensayos de tres y diez días de exposición a muestras de agua del Río Paraná durante el año 2011, evaluados mediante test de Micronúcleos. A y B: expresados como frecuencias de Micronúcleos (MN); C y D: expresados como Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN).

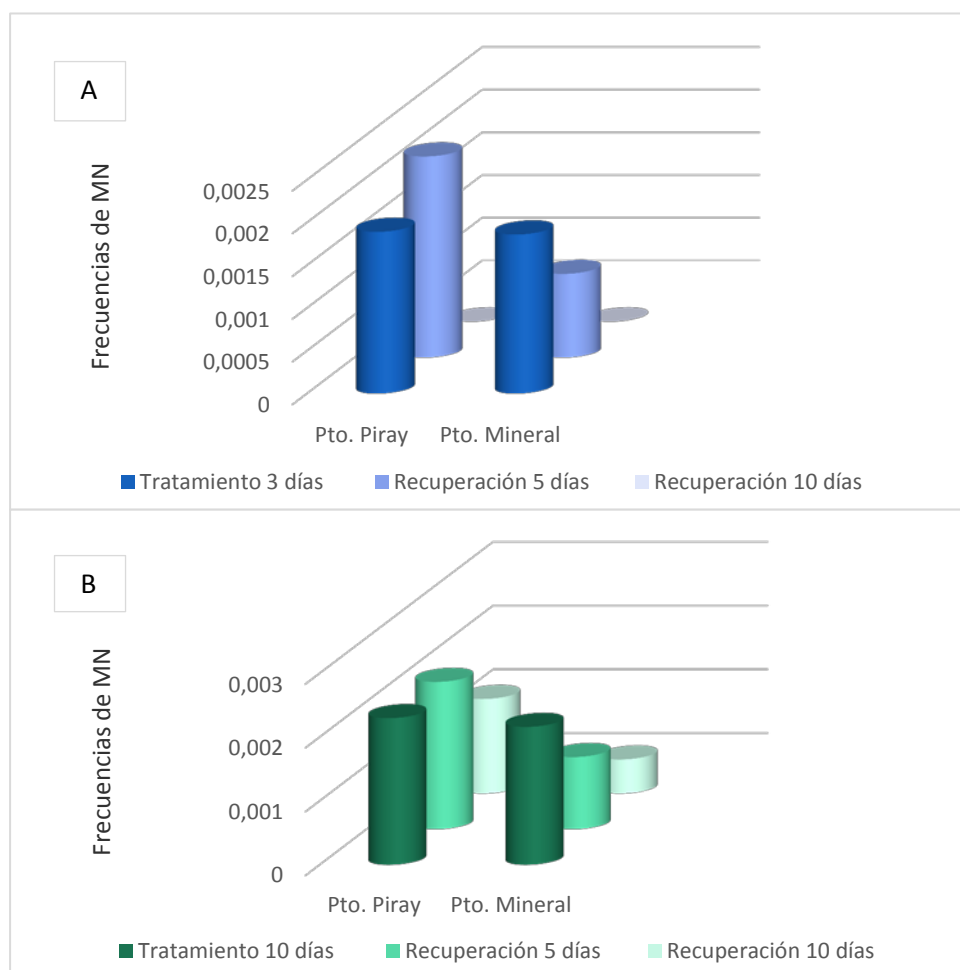


Figura 44. Ensayos de recuperación de daños en el ADN de hialinocitos de *L. fortunei* luego de bioensayos de tres y diez días de exposición a muestras de agua del Río Paraná durante el año 2011, expresadas como frecuencias de Micronúcleos (MN).

Las frecuencias de hialinocitos multinucleados en esta especie, disminuyeron al quinto día de recuperación para luego incrementarse al alcanzar el décimo día ante los tratamientos agudos con aguas de Pto. Piray.

En relación a Pto. Mineral, las frecuencias de hialinocitos binucleados y trinucleados se redujeron progresivamente durante los ensayos de recuperación, repitiendo la misma secuencia que la especie anterior (figura 45).

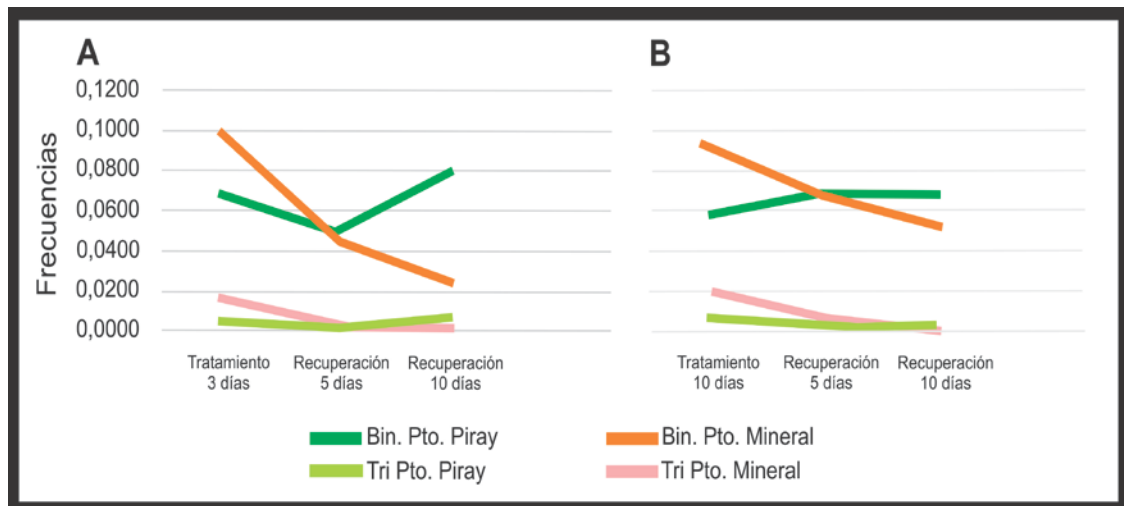


Figura 45. Frecuencias de hialinocitos binucleados (Bin) y trinucleados (Tri) en extendidos de hemolinfa de *L. fortunei* luego de ensayos de recuperación de daños en el ADN para tratamientos con muestras de agua del Río Paraná: A) luego de tratamientos de 3 días y B) luego de tratamientos de 10 días con aguas de Pto. Piray y Pto. Mineral.

Finalmente, las frecuencias de MN en los peces no mostraron reducción de sus valores en respuesta a ninguno de los tiempos de recuperación de daños (figura 46). De hecho, a diferencia de lo ocurrido con las especies de bivalvos, las frecuencias se incrementaron y se mantuvieron por encima de los valores obtenidos en los tratamientos de origen.

En el anexo IV, tablas XXIV y XXV, se detallan las frecuencias de MN y AMN y el total de células analizadas en función del tiempo de recuperación y tratamientos respectivos.

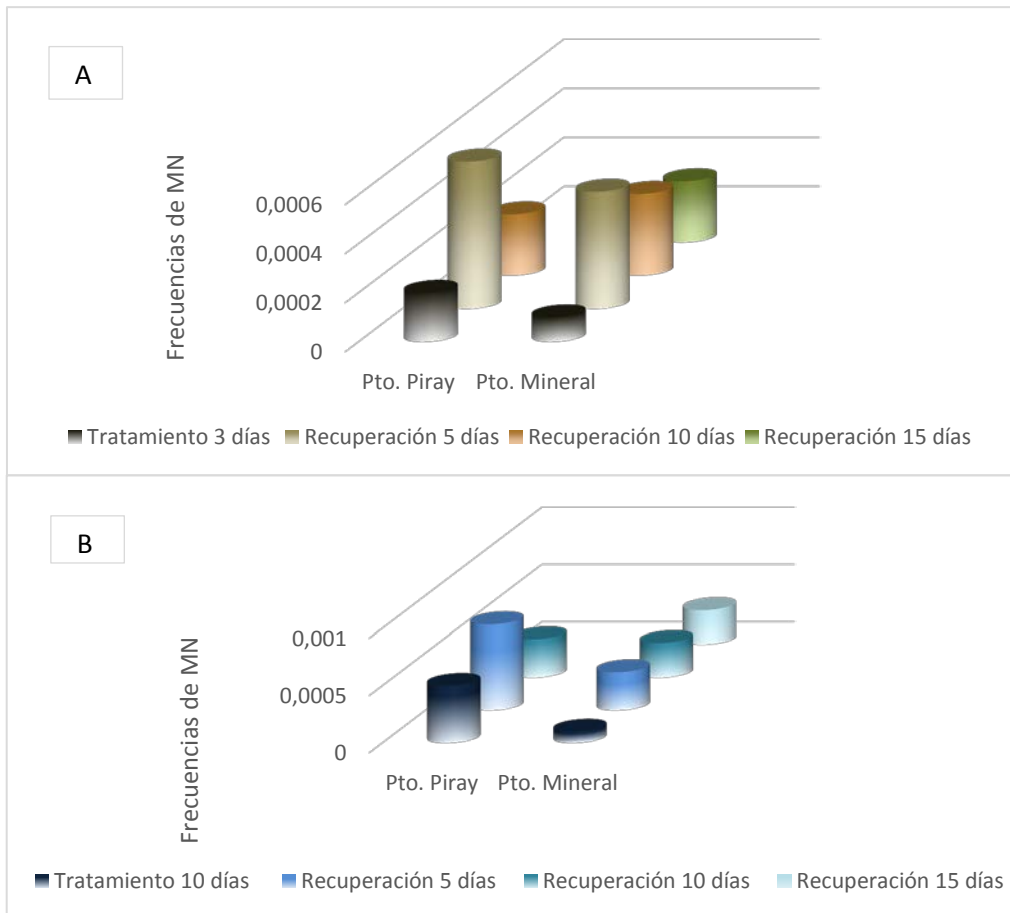


Figura 46. Ensayos de recuperación de daños en el ADN de eritrocitos de *S. brevipinna* luego de bioensayos de tres días (A) y diez días (B) de exposición a muestras de agua del Río Paraná durante el año 2011, evaluados mediante el test de Micronúcleos (MN).

En lo que respecta a las AMN, se observó una clara reducción de sus frecuencias a medida que avanzaron los tiempos de recuperación (figura 47).

Los tipos de alteraciones nucleares más numerosas fueron similares a las encontradas en los tratamientos: núcleos lobulares, núcleos en forma arriñonada y con gemaciones. No obstante, hubo un notable incremento en el número de eritrocitos binucleados y en forma de ocho, en relación a los encontrados en los tratamientos.

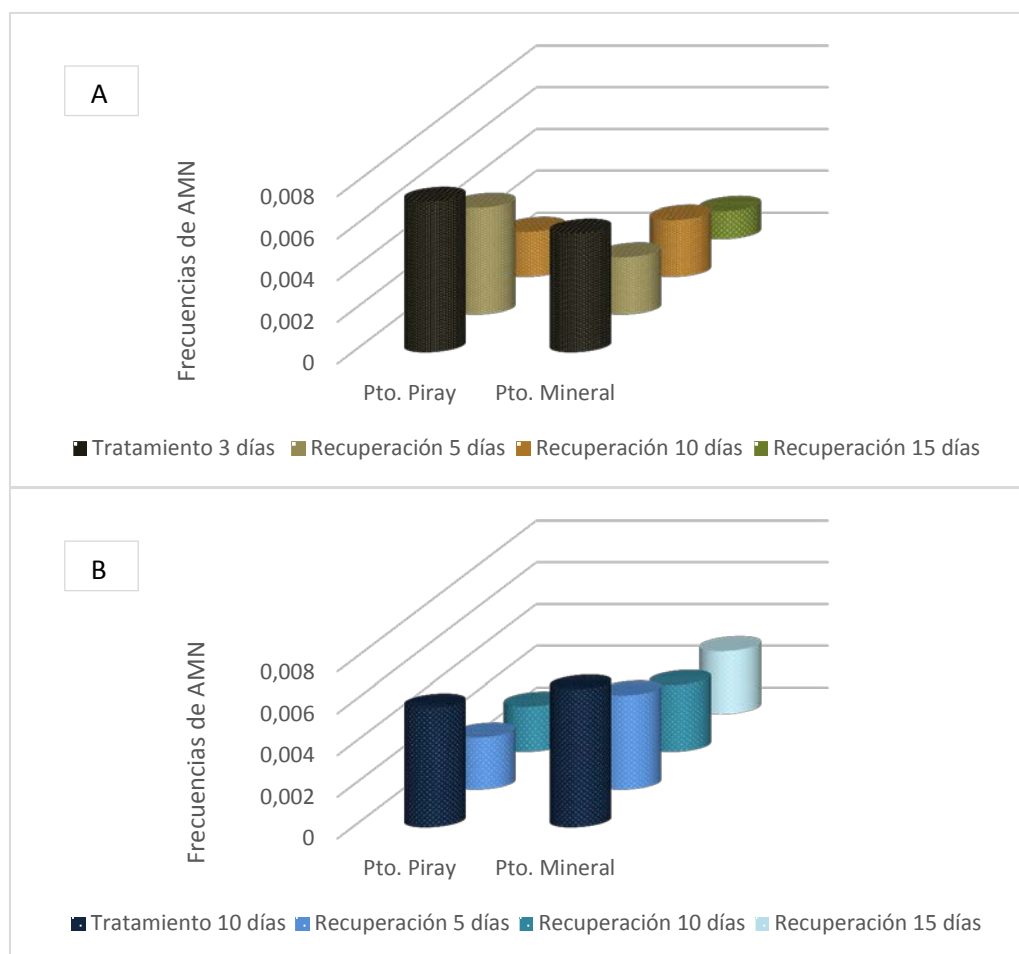


Figura 47. Ensayos de recuperación de daños en el ADN de eritrocitos de *S. brevipinna* luego de bioensayos de tres días (A) y diez días (B) de exposición a muestras de agua del Río Paraná durante el año 2011, evaluados mediante Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN).

Finalmente, tal como se realizó con ensayo cometa, se evaluaron los porcentajes de reducción en el número de células con MN y AMN considerando también su relación con los datos obtenidos del control negativo (tablas IX, X y XI).

En los bivalvos, el porcentaje de reducción de MN fue elevado, evidenciando inclusive menor número de células micronucleadas que en el control negativo cuando se los compara con los tratamientos de exposición tanto de 3 como 10 días con aguas de Pto. Piray y Pto. Mineral. Esto se puso de manifiesto con valores de entre 1,1 % y 6 % de reducción en el daño al ADN, más acentuada en los hialinocitos para ambas especies.

A diferencia de lo expresado para los bivalvos, en los peces prácticamente no se observaron reducciones del daño en el ADN mediante este biomarcador. Es decir, como se vio en la figura 46, el número de células micronucleadas contabilizadas al alcanzar el

máximo tiempo de recuperación (10 o 15 días respectivamente), en la mayoría de los casos excedió al de los tratamientos iniciales.

Por otra parte, las AMN mostraron una reducción tanto en los granulocitos de ambas especies de bivalvos como en los eritrocitos de peces para ambos tratamientos y tiempos de exposición. El número de células con alteraciones de la morfología nuclear fue inferior a las halladas en los controles negativos de cada especie, principalmente en los ensayos derivados de tratamientos agudos con aguas de ambos sitios de muestreo.

Tabla IX: Porcentajes (%) de reducción en las frecuencias de micronúcleos (MN) de granulocitos (G) y hialinocitos (H) de bivalvos luego de ensayos de recuperación de daños en el ADN posteriores a tratamientos de 3 y 10 días con aguas del río Paraná.

	% Reducción MN*							
	Tratamiento 3 días				Tratamiento 10 días			
	Pto. Piray		Pto. Mineral		Pto. Piray		Pto. Mineral	
	G	H	G	H	G	H	G	H
<i>C. fluminea</i>	1,13	3	1,5	4	0,6	3	1,2	2
<i>L. fortunei</i>	1,54	1,75	2,5	1,6	0,72	3	1,1	6

*% Reducción MN= N° MN tratamiento – N° MN recuperación / N° MN tratamiento – N° MN control negativo.

Tabla X: Porcentajes (%) de reducción en las frecuencias de alteraciones de la morfología nuclear (AMN) de granulocitos de bivalvos luego de ensayos de recuperación de daños en el ADN posteriores a tratamientos de 3 y 10 días con aguas del río Paraná durante.

	% Reducción AMN *			
	Tratamiento 3 días		Tratamiento 10 días	
	Pto. Piray	Pto. Mineral	Pto. Piray	Pto. Mineral
<i>C. fluminea</i>	5	3,77	0,75	0,52
<i>L. fortunei</i>	2,1	1,35	0,93	0,87

*% Reducción AMN= N° AMN tratamiento – N° AMN recuperación / N° AMN tratamiento – N° AMN control negativo.

Tabla XI: Porcentajes (%) de reducción en las frecuencias de micronúcleos (MN) y alteraciones de la morfología nuclear (AMN) de eritrocitos de *S. brevipinna* luego de ensayos de recuperación de daños en el ADN posteriores a tratamientos de 3 y 10 días con aguas del río Paraná.

% Reducción*	Tratamiento 3 días		Tratamiento 10 días	
	Pto. Piray	Pto. Mineral	Pto. Piray	Pto. Mineral
MN	0	0	0,75	0
AMN	1,14	1,07	1,01	0,87

*% Reducción MN/AMN= $\frac{N^{\circ} \text{ MN/AMN tratamiento} - N^{\circ} \text{ MN/AMN recuperación}}{N^{\circ} \text{ MN/AMN tratamiento} - N^{\circ} \text{ MN/AMN control negativo}}$.

SECCIÓN IV

ENSAYOS *IN VITRO*

CÉLULAS CHO-K1

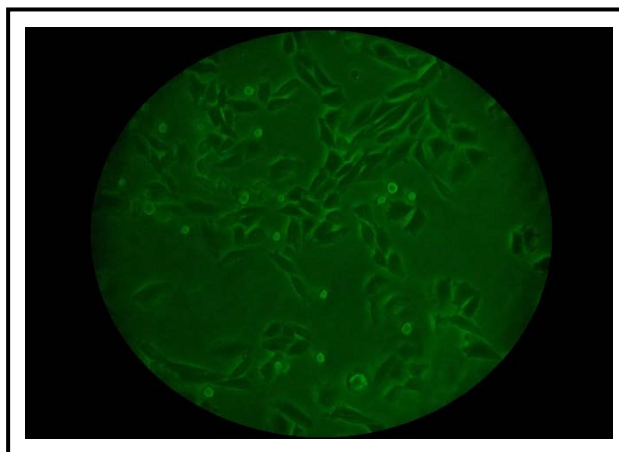


Figura 48. Células CHO-K1 en cultivo de adherencia. Imagen obtenida mediante microscopía invertida con aumento de 400X.

La viabilidad celular estimada mediante el colorante vital azul de tripán en las células CHO-K1 (figura 48), fue superior al 90 % para todos los tratamientos y años de estudio.

Los resultados obtenidos luego de 2 hs de exposición a los diferentes tratamientos para el ensayo cometa y de 15 hs para el test de MN y AMN, se presentan a continuación:

ENSAYO COMETA:

El análisis de Shapiro-Wilks para establecer la normalidad de los datos procedentes de este ensayo, mostró valores altamente significativos de $p < 0,0001$. Por lo tanto, las pruebas estadísticas aplicadas para la comparación de estos resultados se basaron en el análisis de la varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis.

El único sitio que presentó ID significativamente mayores al control negativo durante los tres años de estudio, fue Pto. Piray ($p < 0,05$).

La comparación de los valores promedio de daño en el ADN entre los años 2009, 2010 y 2011, mostró que en los dos últimos años se presentaron los índices más elevados, de manera similar a lo ocurrido en los ensayos *in vivo* (figura 49).

Los sitios Iguazú y Pto. Mineral también exhibieron valores significativamente superiores al control negativo en los años 2010 y 2011 respectivamente. Estas respuestas coinciden con la disminución en la calidad de las aguas del Río Paraná durante este periodo.

A diferencia de lo observado hasta el momento con los ensayos anteriores, Posadas fue el único sitio cuyas muestras de agua no presentaron valores de daño que excedieran a los controles.

La respuesta de las células CHO-K1 ante los diferentes tratamientos *in vitro* fue muy contundente, destacándose una clara diferencia entre los ID obtenidos para los controles positivo y negativo.

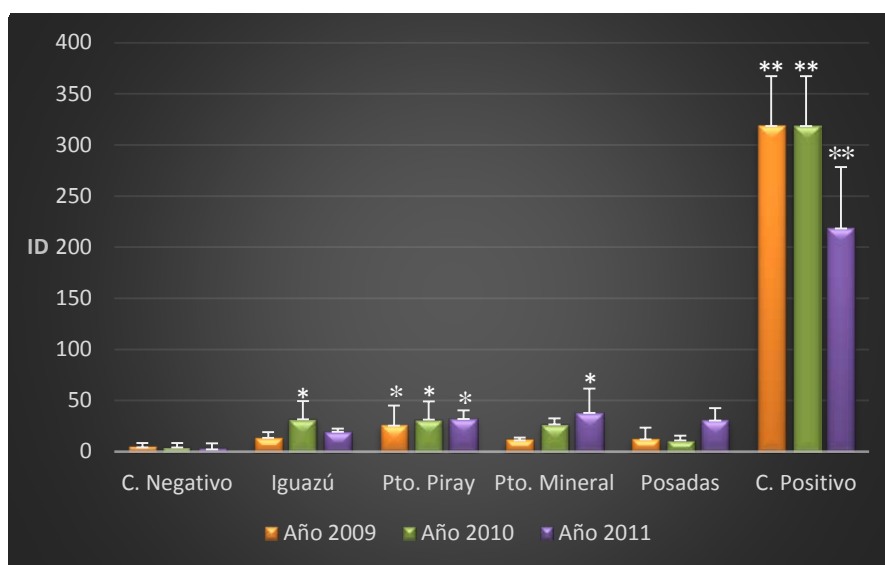


Figura 49. Índices de daño en el ADN (ID) de células CHO-K1 evaluados mediante ensayo cometa luego de 2 hs de exposición a muestras de agua del Río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011. Diferencias significativas respecto al control negativo determinadas mediante Kruskal-Wallis: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

El mayor porcentaje de nucleoides analizados en los tratamientos y controles negativos, se concentraron dentro de la clase de cometas tipo 0, promediando un total de 84 % de las células CHO-K1 en esta categoría que representa ausencia de daño en el ADN. En menor proporción y en orden descendente, se encontraron cometas de clase 1, 2, 3 y 4, categorías que implican daños leves a intensos, respectivamente (anexo III, tablas XXV – XXVII).

El control positivo representó la única excepción a esta distribución entre clases de cometas. En este caso, el 53 % de las células analizadas presentaron nucleoides de clase 4, con el máximo grado de daño en su ADN y tan sólo el 17 % se agrupó en la categoría de clase 0 (figura 50).

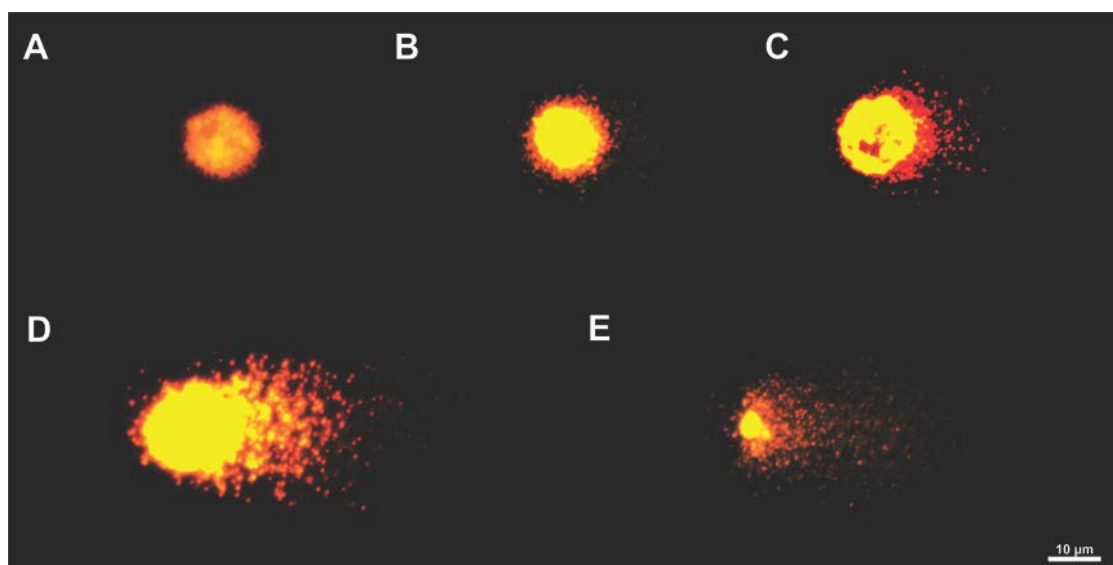


Figura 50. Lesiones en el ADN detectadas mediante ensayo cometa en células CHO-K1 expuestas *in vitro* a tratamientos con aguas del Río Paraná y controles: A) clase 0; B) clase 1; C) clase 2; D) clase 3 y E) clase 4. Aumento: 400X.

TEST DE MICRONÚCLEOS (MN) Y ALTERACIONES DE LA MORFOLOGÍA NUCLEAR (AMN):

El test de Shapiro-Wilks empleado para el análisis de normalidad de los datos derivados del test de MN y AMN, arrojó valores comprendidos entre $p= 0,6397$ y $p= 0,9810$. A partir de la prueba F se obtuvieron valores de p comprendidos entre $0,1436$ y $0,8740$ demostrando homogeneidad de varianzas.

Por lo tanto, para un intervalo de confianza del 95 %, se asumió que dichos datos siguieron una distribución normal y los distintos tratamientos fueron contrastados estadísticamente mediante el análisis de la varianza para comparaciones múltiples (ANOVA) y el test LSD de Fisher para comparaciones entre pares de muestras.

Si bien en general todos los sitios evaluados mediante exposición *in vitro*, mostraron frecuencias de MN superiores a las del control negativo, sólo se vieron diferencias significativas con los tratamientos realizados durante los años 2010 y 2011 (figura 51). Durante el 2010, sólo Pto. Mineral manifestó incrementos significativos en las frecuencias de MN de las células analizadas respecto a las del control negativo ($p < 0,05$). En el año 2011, sin embargo, todas las muestras de agua empleadas en los tratamientos

manifestaron frecuencias de MN significativamente superiores al control, más evidentes en los sitios Iguazú y Pto. Piray ($p < 0,01$).

Nuevamente, el incremento en el daño genético se corresponde con la reducción en los valores del ICA para todos los sitios y más aún en las muestras provenientes del norte de la provincia.

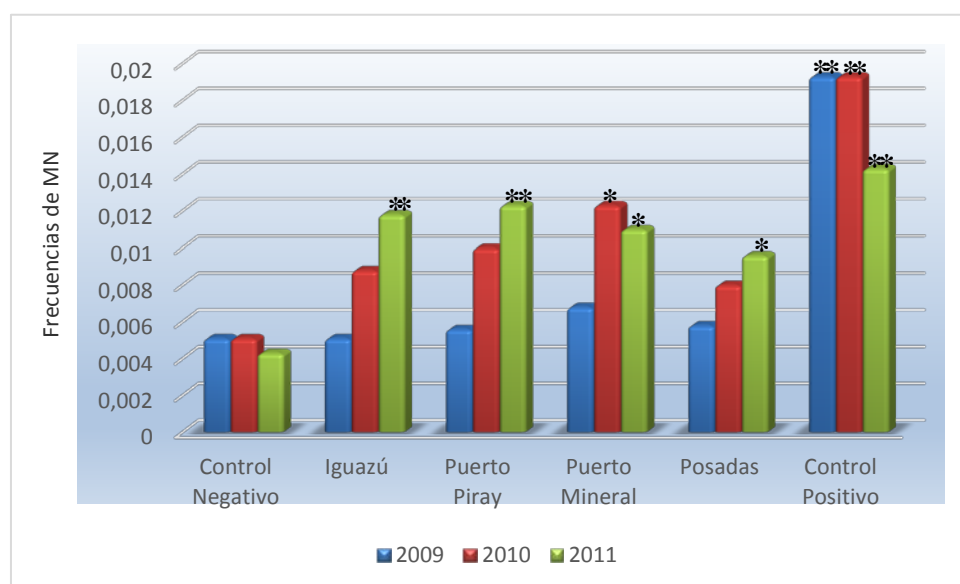


Figura 51. Frecuencias de Micronúcleos (MN) en células CHO-K1 luego de exposiciones *in vitro* de 15 hs a tratamientos con aguas del Río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011. Diferencias significativas respecto al control negativo determinadas mediante ANOVA y test LSD de Fisher: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Respecto a las AMN, no se obtuvieron diferencias significativas respecto al control negativo para ninguno de los tratamientos y años de estudio. Sólo alcanzaron valores lo suficientemente elevados las frecuencias correspondientes al control positivo (figura 52). A pesar de ello, fue posible notar que el número de células con alteraciones de la morfología nuclear se incrementó en los años 2010 y 2011 principalmente en los tres primeros sitios de muestreo: Iguazú, Pto. Piray y Pto. Mineral. Las frecuencias de AMN más elevadas en cada uno de estos sitios, se correspondió con las frecuencias de MN que alcanzaron incrementos significativos respecto al control negativo en los respectivos años.

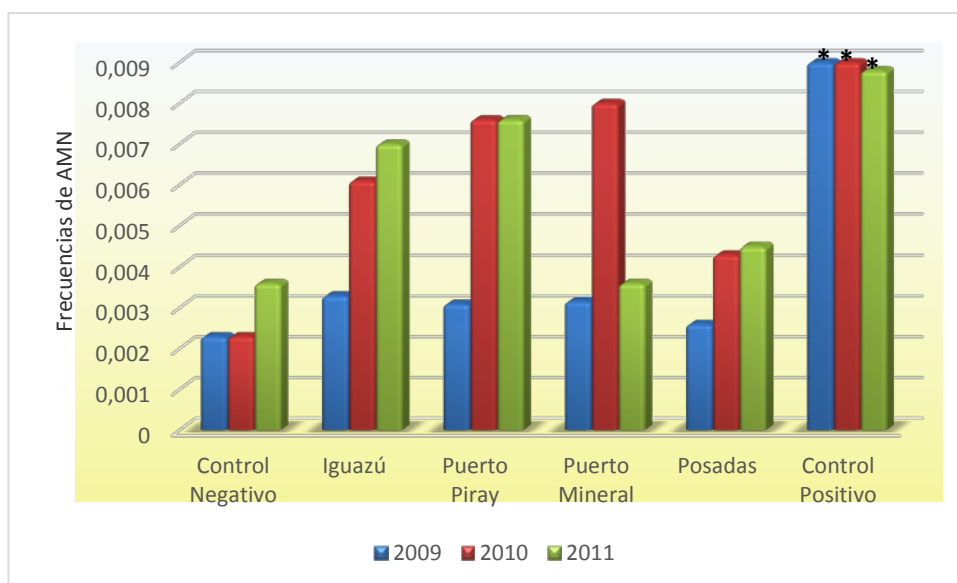


Figura 52. Frecuencias de Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en células CHO-K1 luego de exposiciones *in vitro* de 15 hs a tratamientos con aguas del Río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011. Diferencias significativas respecto al control negativo determinadas mediante ANOVA y test LSD de Fisher: * $p < 0,05$.

Las AMN encontradas en los extendidos de estas células fueron clasificadas en dos tipos: núcleos con gemaciones y puentes cromatínicos. Estos últimos fueron observados tanto en núcleos interfásicos, ya sea entre dos núcleos de una célula binucleada o bien entre un micronúcleo y el núcleo principal de la célula; como en núcleos en división, principalmente formando puentes cromatínicos entre cromosomas anafásicos/telofásicos (figura 53). La alteración más frecuente fue la presencia de gemaciones nucleares, representadas por el 90% de las AMN encontradas y el 10 % restante correspondió a la presencia de puentes cromatínicos. La distribución de ambos tipos de AMN entre los tratamientos y controles se presenta en la figura 54. Ocasionalmente se observaron también células binucleadas, aunque en su mayoría iniciando procesos apoptóticos y por ello no fueron consideradas dentro de las AMN.

Se estableció el recuento de células con características apoptóticas y los porcentajes de dichas células en cada tratamiento fueron los siguientes: 0,04 % para el control negativo; 0,072 % para Iguazú; 0,16 % para Pto. Piray; 0,077 % para Pto. Mineral; 0,088 % para Posadas y finalmente 0,2 % para el control positivo con Metilmetanosulfonato (MMS).

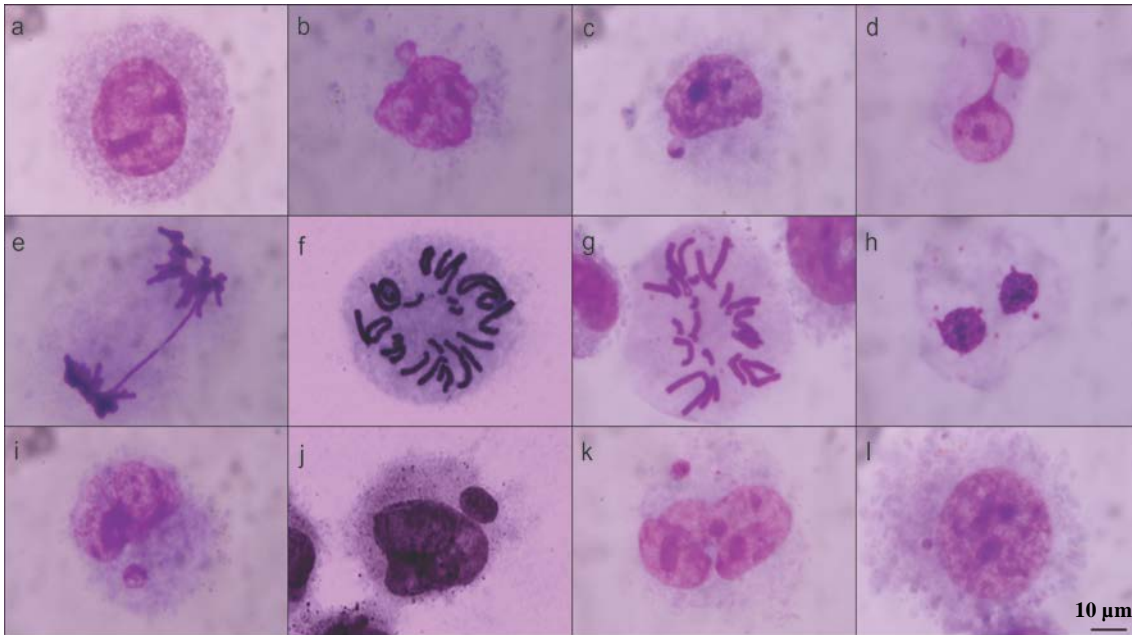


Figura 53. Extendidos de células CHO-K1 analizados mediante test de MN y AMN luego de tratamientos *in vitro* con aguas del Río Paraná: a) célula normal; b – c) gemación nuclear; d) puente cromatínico en interfase; e) puente cromatínico entre cromosomas anafásicos/telofásicos; f – g) células en división mitótica; h) célula binucleada en inicio de apoptosis; i – l) células con micronúcleos.

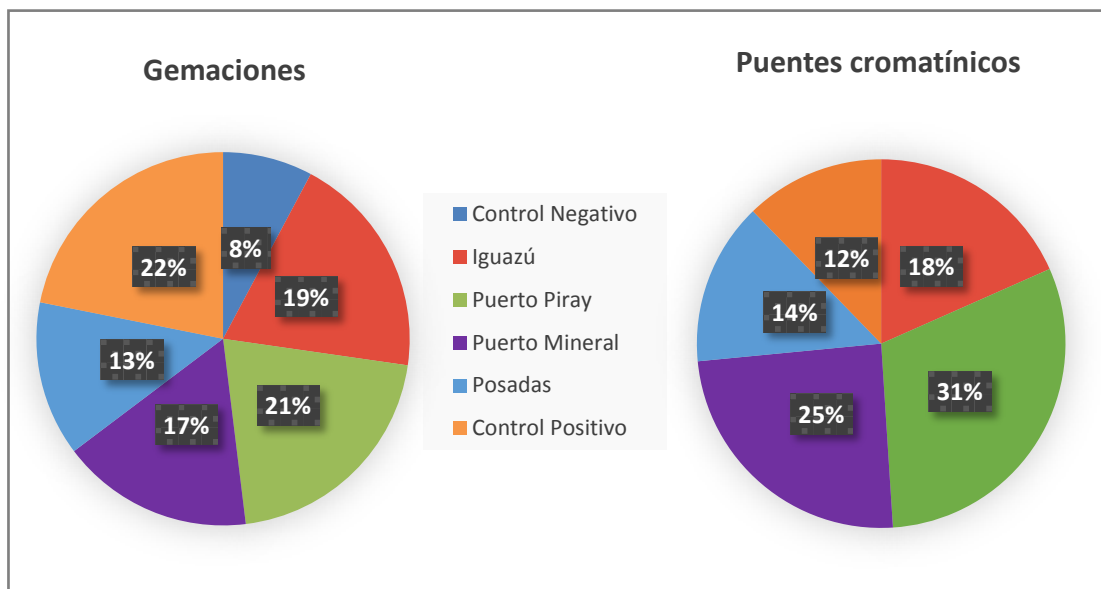


Figura 54. Distribución de los tipos de AMN encontradas en células CHO-K1 entre los distintos tratamientos realizados *in vitro* con aguas del Río Paraná.

Adicionalmente al recuento de células apoptóticas, los resultados obtenidos del análisis de citotoxicidad generada por los diferentes tratamientos *in vitro* se presentan también en función del índice mitótico (IM) en la figura 55.

El mayor número de células en división dentro de cada tratamiento, se encontró durante los ensayos realizados en el año 2009, donde la calidad de las muestras de agua fue mayor y menor el grado de daño genotóxico observado. Posteriormente, los IM se redujeron en los años posteriores a medida que se incrementó el daño en el ADN producto de los tratamientos con las distintas muestras de agua del Río Paraná cuya calidad fue menor. El sitio de muestreo donde se pudo apreciar un claro incremento gradual en la citotoxicidad de las células analizadas (disminución progresiva de los IM) en relación a la menor calidad de sus aguas, fue Iguazú.

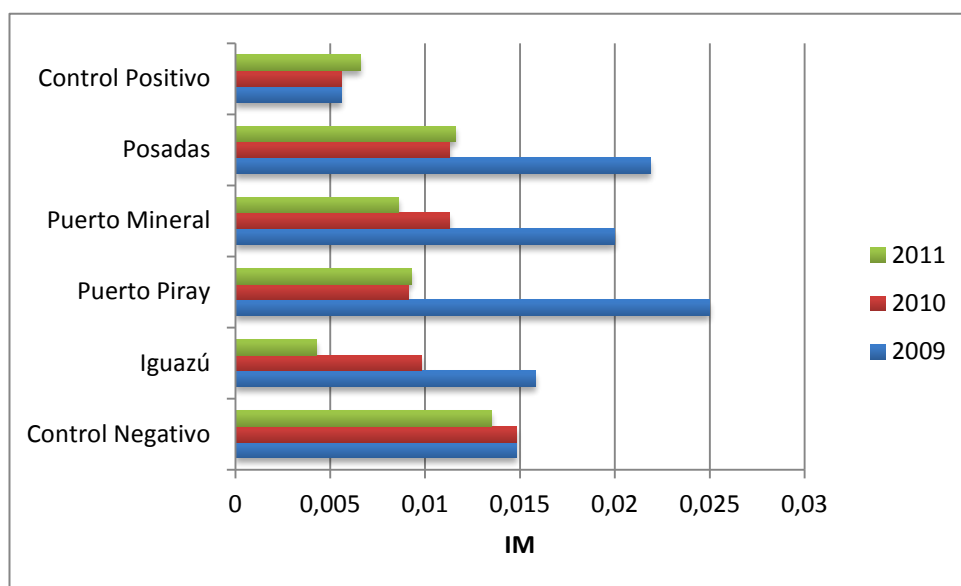


Figura 55. Índices mitóticos (IM) calculados en células CHO-K1 expuestas a tratamientos con aguas del Río Paraná y controles durante los años 2009, 2010 y 2011.

SECCIÓN V

ANÁLISIS GENERAL

Con la finalidad de establecer un análisis general de los resultados obtenidos durante el periodo de estudio completo, que permitiera establecer comparaciones entre los distintos modelos biológicos y biomarcadores empleados; así como la relación entre la respuesta al daño genotóxico y las calidad de las muestras de agua del río Paraná, se analizaron los datos en conjunto.

El ICA general obtenido mediante el promedio de los valores de los índices de calidad durante los tres años (2009, 2010 y 2011) en cada sitio de muestreo evaluado, se presenta en la figura 56.

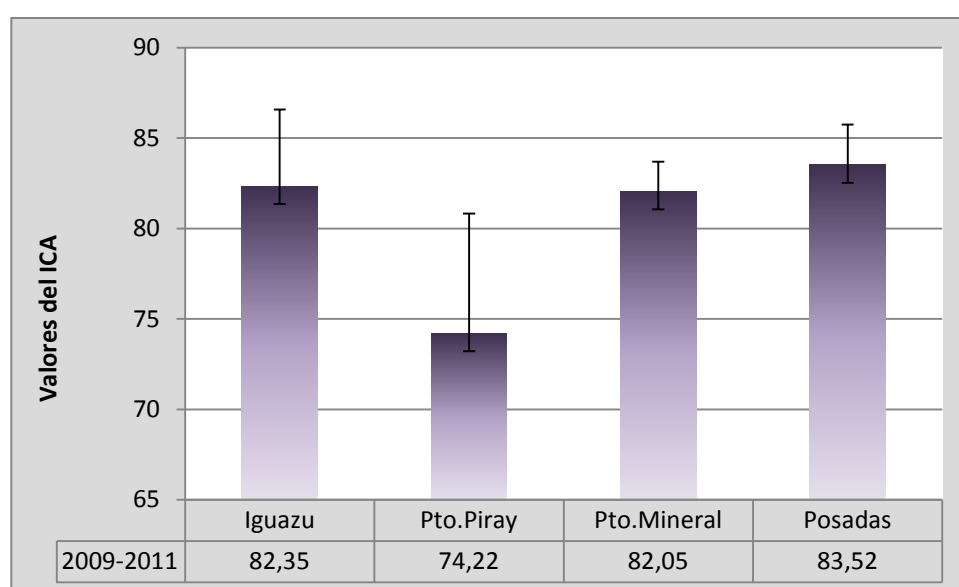


Figura 56. Índice de Calidad de Agua (ICA) general promedio (\pm Desvío Estándar) estimado para todo el periodo de estudio (2009-2011) en cada sitio de muestreo sobre el Río Paraná.

Los valores obtenidos mostraron índices de calidad similares entre los sitios de estudio, encontrándose todos ellos dentro del rango considerado de buena calidad de sus aguas. Se pudo apreciar que el ICA para Pto. Piray fue el menor de la serie y a su vez, con una marcada tendencia descendente en la calidad de sus aguas a través del tiempo. A pesar de ello, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los ICA de las cuatro localidades estudiadas. Los otros tres sitios presentaron valores de ICA generales muy próximos, donde Pto. Mineral, Iguazú y Posadas constituyeron la secuencia de menor a mayor índice de calidad.

ENSAYO COMETA:

Se aplicó el test de normalidad de Shapiro-Wilks para los datos totales productos del ensayo cometa en cada modelo biológico analizado y se obtuvieron diferencias altamente significativas ($p= 0,0042 - p < 0,0001$). Por lo tanto, los análisis estadísticos para este ensayo se realizaron mediante el test no paramétrico de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis, tanto para los bioensayos agudos como subcrónicos. Debido a que en los ensayos *in vitro* las células CHO-K1 fueron expuestas a los tratamientos únicamente durante 2 h, este modelo fue contrastado con los demás bioindicadores dentro de los análisis agudos equivalentes a 3 días de exposición para los organismos *in vivo*.

El análisis global de los índices de daño (ID) en el ADN mostró respuestas similares en todos los modelos biológicos estudiados (figura 57). Se observaron valores estadísticamente superiores al control negativo en los cuatro bioindicadores para Pto. Piray y Pto. Mineral luego de los ensayos agudos. Una menor respuesta al daño pudo apreciarse para los sitios Iguazú y Posadas.

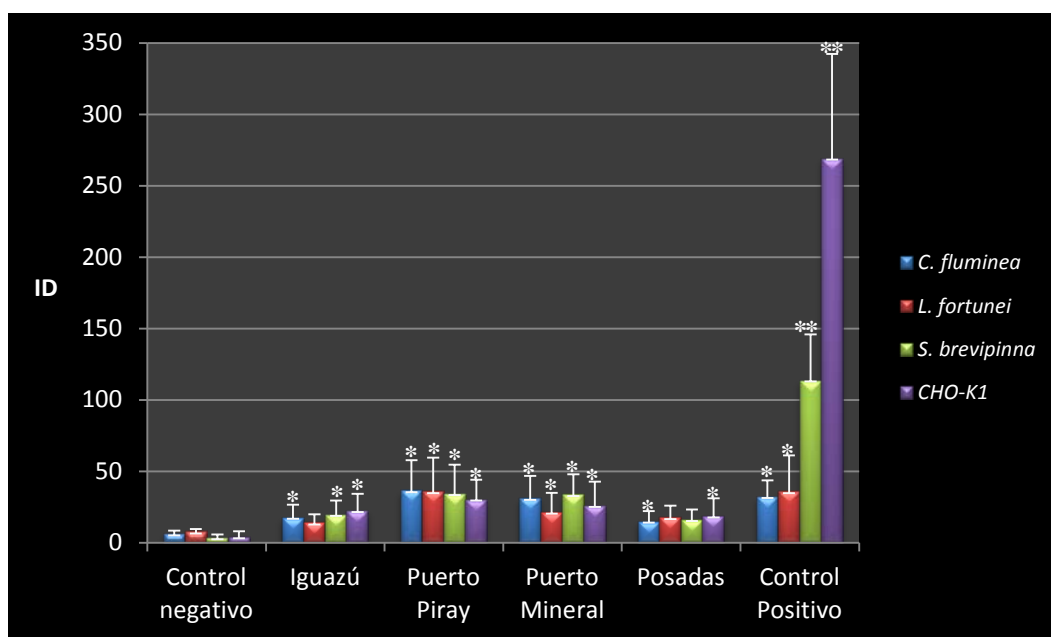


Figura 57. Índices de daño en el ADN (ID) detectados mediante ensayo cometa en las especies *Corbicula fluminea*, *Limnoperna fortunei* y *Steindachnerina brevipinna* luego de ensayos agudos de 3 días; y en células CHO-K1 luego de ensayos agudos de 2 h con muestras de agua del Río Paraná y controles en el periodo 2009-2011.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

La comparación entre modelos biológicos por sitio de muestreo, no evidenció diferencias estadísticas entre los ID estimados para los tratamientos Iguazú, Pto. Piray, Posadas y para el control negativo ($p= 0,1201 - 0,9820$), pero sí para Pto. Mineral y para el control positivo.

Si bien los valores de ID para *Limnoperna fortunei* luego de los ensayos de exposición de tres días con muestras de agua de Pto. Mineral fueron significativamente superiores al control negativo correspondiente y similares al de las células CHO-K1, esta especie se diferenció desde el punto de vista estadístico de las especies *C. fluminea* y *S. brevipinna*, por presentar menores índices de daño en el ADN ($p= 0,0107$). Del mismo modo, las respuestas ante el daño ocasionado por el agente empleado en el control positivo fueron significativamente superiores en *S. brevipinna* y en las células CHO-K1 respecto a las especies de bivalvos ($p= 0,0003$).

Los resultados obtenidos para los bioensayos de exposición durante diez días fueron similares en las tres especies, encontrándose incrementos significativos de los ID en respuesta a los tratamientos con aguas de Pto. Piray y Posadas respecto a los controles negativos (figura 58). A pesar de que en los bioensayos con muestras de agua de Iguazú sólo los peces mostraron ID significativamente mayores al control negativo y lo mismo ocurrió para los mejillones en relación a Pto. Mineral, no se obtuvieron diferencias significativas al comparar los ID entre especies para ningún tratamiento ni para el control negativo ($p= 0,1350 - 0,9132$). La única distinción clara se dio nuevamente en respuesta al control positivo, donde *S. brevipinna* incrementó significativamente el índice de daños respecto a los bivalvos ($p= 0,0046$).

Para este tiempo de exposición a las distintas muestras de agua, las respuestas observadas en cuanto al daño provocado en el ADN no se condicen en general con los valores de los ICA obtenidos. Sólo se mantienen invariables los resultados de tratamientos con aguas de Pto. Piray, tanto al tercer como décimo día de exposición a dichas muestras y en todos los modelos biológicos analizados.

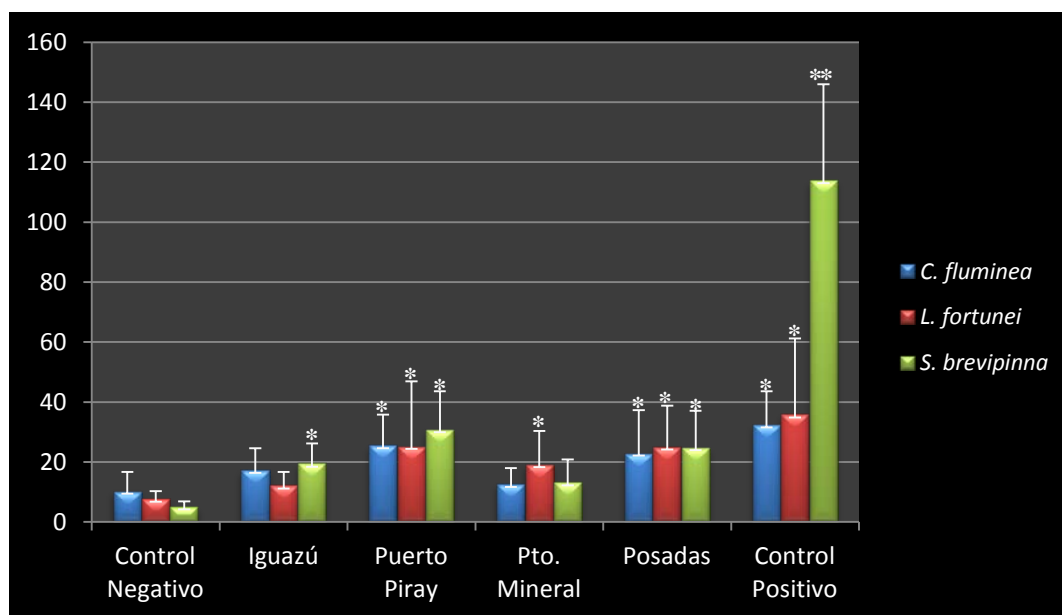


Figura 58. Índices de daño en el ADN (ID) detectados mediante ensayo cometa en las especies *Corbicula fluminea*, *Limnoperna fortunei* y *Steindachnerina brevipinna* expuestas durante 10 días a muestras de agua del Río Paraná y controles en el periodo 2009-2011. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

TEST DE MICRONÚCLEOS (MN) Y ALTERACIONES DE LA MORFOLOGÍA NUCLEAR (AMN):

La aplicación del test de normalidad de Shapiro-Wilks a los datos totales obtenidos para los ensayos de MN y AMN tanto *in vivo* como *in vitro*, reveló valores de $p < 0,0001$ – $p = 0,0160$. Estos valores altamente significativos demostraron que no existió distribución normal de las frecuencias analizadas y por lo tanto se utilizó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis en la comparación de los resultados.

Para establecer comparaciones entre los modelos *in vivo* e *in vitro* se tomaron en cuenta las dos subpoblaciones celulares encontradas en la hemolinfa de los bivalvos de manera independiente.

El test de MN y AMN evidenció respuestas más variables de los diferentes modelos biológicos a los tratamientos que el ensayo cometa. Los únicos sitios donde se obtuvieron diferencias significativas respecto a los controles negativos luego de los ensayos agudos, fueron Pto. Piray y Pto. Mineral (figura 59). Las especies cuyas frecuencias se incrementaron significativamente correspondieron a *C. fluminea* (sólo para los granulocitos); *S. brevipinna* y células CHO-K1 tratadas *in vitro* ($p < 0,05$).

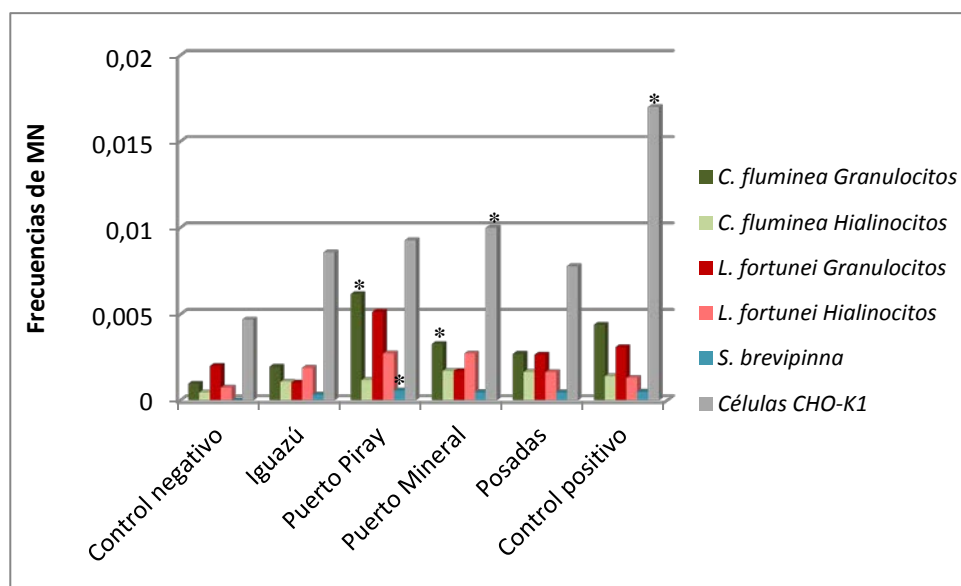


Figura 59. Frecuencias de Micronúcleos (MN) en hemocitos (hialinocitos y granulocitos) de *Corbicula fluminea*, *Limnoperna fortunei* y eritrocitos de *Steindachnerina brevipinna* luego de tratamientos agudos de 3 días; y en células CHO-K1 luego de tratamientos agudos de 15 h con aguas del Río Paraná y controles durante el periodo 2009-2011. * $p < 0,05$.

Las frecuencias totales de micronúcleos luego de los bioensayos de diez días de exposición, fueron significativamente superiores al control negativo para las tres especies en respuesta al tratamiento con aguas de Pto. Piray. En tanto para Pto. Mineral y Posadas, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas en los granulocitos de ambas especies de bivalvos. De todas maneras, se observó una disminución de las frecuencias de MN entre el tercer y décimo día de exposición en todos los modelos biológicos y sitios de muestreo. La escala de frecuencias en los ejes respectivos de los gráficos 59 y 60, permiten identificar rápidamente dicha transición.

Al comparar las respuestas de cada modelo biológico frente a los tratamientos agudos, las células CHO se diferenciaron significativamente respecto a los bivalvos y peces por sus frecuencias elevadas de MN en todos los tratamientos y controles ($p < 0,05$). Entre las especies animales, *S. brevipinna* se destacó por presentar un número significativamente menor de MN en relación con los bivalvos para todos los tratamientos y controles, principalmente cuando se incluyeron en el análisis los granulocitos de la hemolinfa ($p = 0,0022 - 0,0341$). Dichas diferencias se limitaron únicamente a los sitios Iguazú y Posadas al contrastar los resultados luego de diez días de exposición ($p = 0,0038 - 0,0375$).

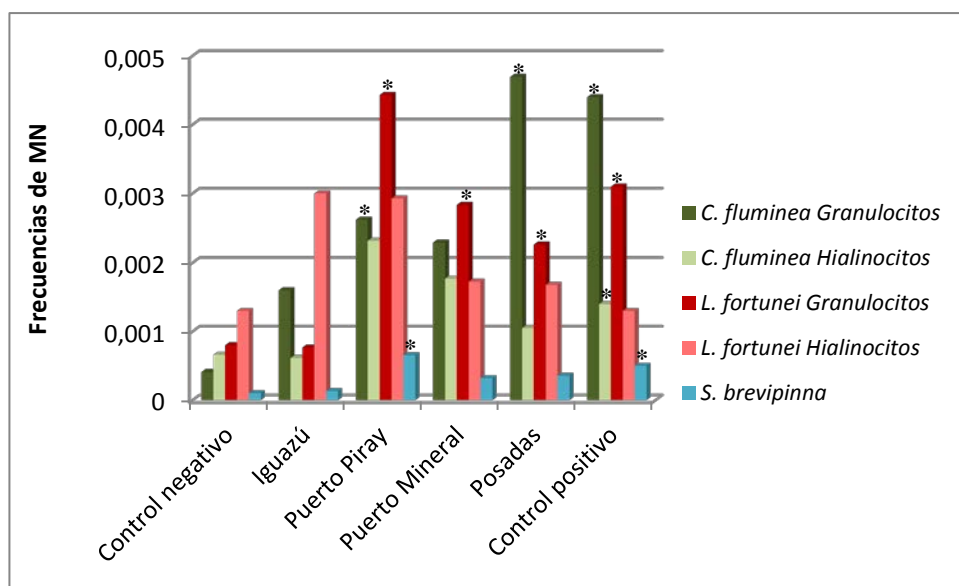


Figura 60. Frecuencias de Micronúcleos (MN) en hemocitos (hialinocitos y granulocitos) de *Corbicula fluminea*, *Limnoperna fortunei* y eritrocitos de *Steindachnerina brevipinna* luego de tratamientos de 10 días con aguas del Río Paraná y controles durante el periodo 2009-2011. * $p < 0,05$.

Con respecto a las AMN totales, los resultados de los tratamientos agudos manifestaron frecuencias significativamente superiores al control negativo para Pto. Pitay, Pto. Mineral y Posadas (figura 61). Al igual que en los MN, las tres especies cuyas frecuencias de AMN fueron superiores desde el punto de vista estadístico, correspondieron a *C. fluminea*, *S. brevipinna* y a las células CHO-K1. El único sitio para el cual los tres modelos biológicos incrementaron significativamente las AMN fue Pto. Piray; mientras que *C. fluminea* constituyó la única especie cuyos valores de AMN superaron al control negativo en los tres puntos de muestreo mencionados. Cabe destacar que esta respuesta fue evidente en la subpoblación celular de los granulocitos.

Los peces y las células CHO se caracterizaron por presentar frecuencias de AMN significativamente menores que las de los moluscos bivalvos en todos los tratamientos y controles ($p < 0,0001 - p = 0,0013$).

Para los bioensayos realizados durante diez días de exposición, los resultados mostraron que en las dos especies de bivalvos, los granulocitos incrementaron significativamente sus frecuencias de AMN respecto al control negativo en todos los sitios de muestreo (figura 62). Los valores hallados fueron significativamente superiores a *S. brevipinna* en todos los tratamientos y controles positivos ($p = 0,0001 - 0,0440$).

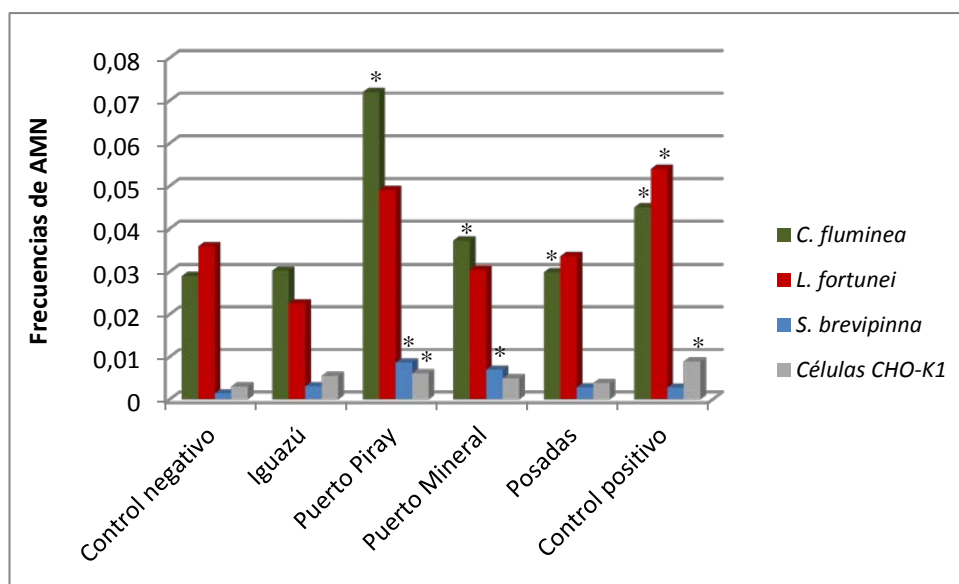


Figura 61. Frecuencias de Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en granulocitos de *Corbicula fluminea*, *Limnoperna fortunei* y eritrocitos de *Steindachnerina brevipinna* luego de tratamientos agudos de 3 días y en células CHO-K1 luego de tratamientos agudos de 15 h con aguas del Río Paraná y controles durante el periodo 2009-2011. * $p < 0,05$.

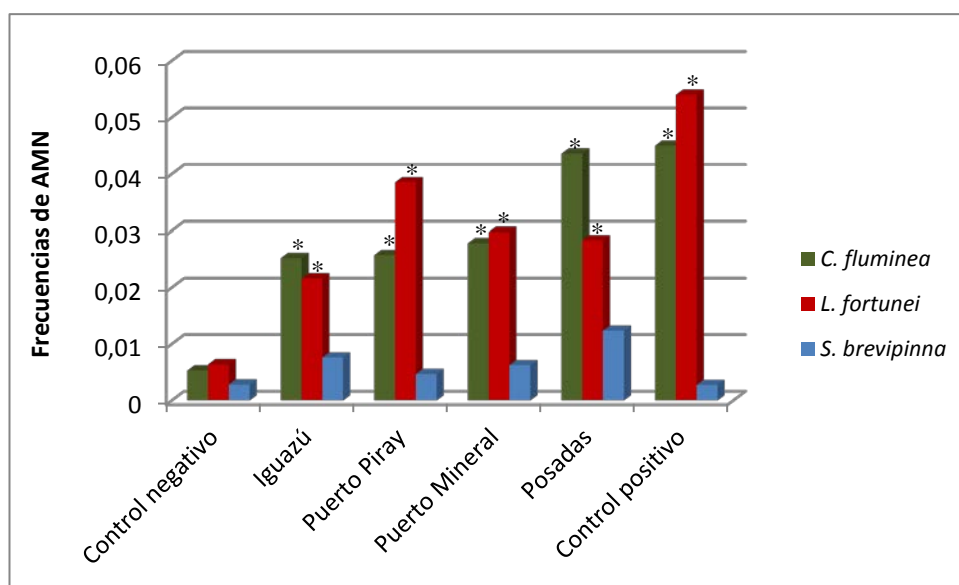


Figura 62. Frecuencias de Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en granulocitos de *Corbicula fluminea*, *Limnoperna fortunei* y eritrocitos de *Steindachnerina brevipinna* luego de tratamientos de 10 días con aguas del Río Paraná y controles durante el periodo 2009-2011. * $p < 0,05$.

Finalmente, se presentan los resultados de los análisis de correlación entre los dos biomarcadores empleados en el estudio luego de cada tratamiento y los ICA correspondientes a cada sitio de muestreo.

En su mayoría, los índices de correlación obtenidos fueron negativos, de manera que el incremento de daños en el ADN se asoció a menores valores de los ICA estimados.

Se encontró que los índices de daño (ID) detectados mediante ensayo cometa mostraron mejor correlación con las variaciones de calidad del agua en todos los modelos biológicos analizados, tanto *in vivo* como *in vitro*, luego de tratamientos agudos. Los índices de correlación estuvieron comprendidos entre $r = -0,69$ para *S. brevipinna* ($p = 0,315$) y $r = -0,95$ para *L. fortunei*, encontrándose sólo para este último valores significativos de $p < 0,05$ (figura 63). Dicha correlación sólo se mantuvo para este ensayo en *S. brevipinna* luego de diez días de exposición aunque sin mostrar valores estadísticos significativos. En las especies de bivalvos, los índices descendieron a $r = -0,57$ ($p = 0,434$) y $r = -0,42$ ($p = 0,576$) para *C. fluminea* y *L. fortunei*, respectivamente (figura 64).

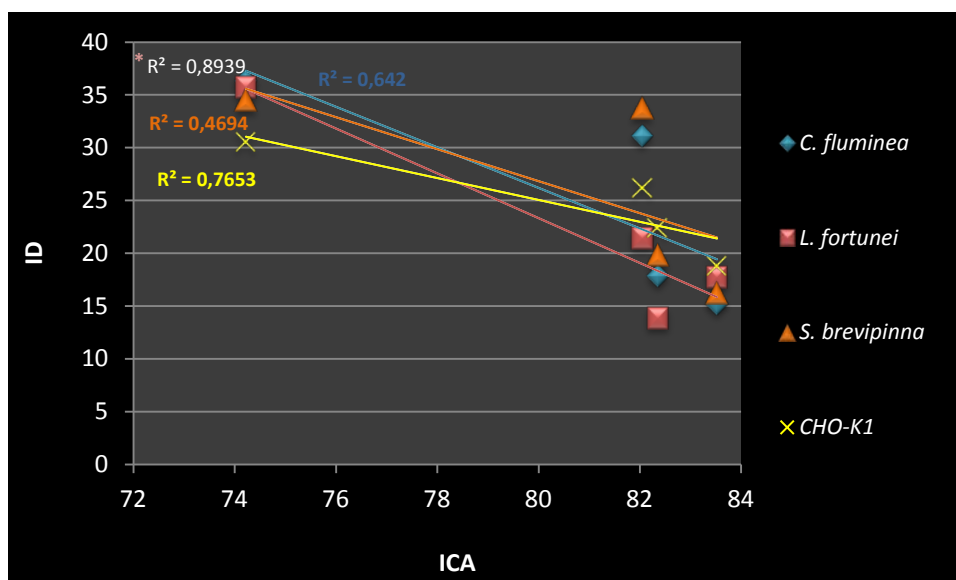


Figura 63. Gráfico de dispersión y líneas de tendencias entre índices de daño en el ADN (ID) detectados mediante ensayo cometa e índices de calidad de agua (ICA) de los sitios de muestreo al que fueron expuestos ejemplares de *C. fluminea*, *L. fortunei* y *S. brevipinna* en ensayos agudos de 3 días y de 2 h para células CHO-K1 (* $p < 0,05$).

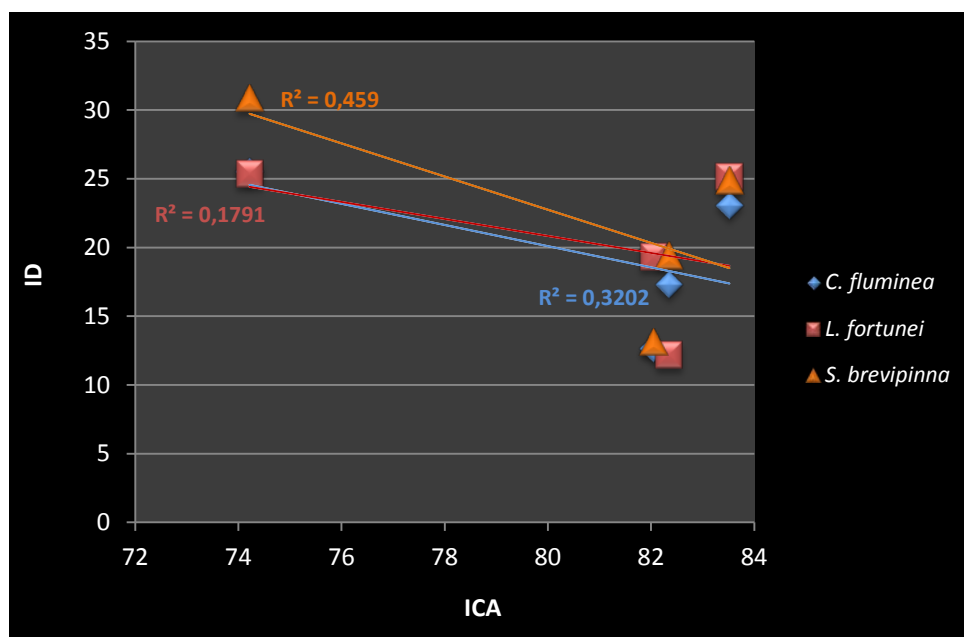


Figura 64. Gráfico de dispersión y líneas de tendencias entre índices de daño en el ADN (ID) detectados mediante ensayo cometa e índices de calidad de agua (ICA) de los sitios de muestreo al que fueron expuestos ejemplares de *C. fluminea*, *L. fortunei* y *S. brevipinna* durante 10 días.

La evaluación de correlación entre los MN y AMN encontrados y los ICA respectivos a cada sitio de muestreo, fue realizada respetando en los bivalvos ambas subpoblaciones celulares de hemolinfa. El mayor grado de asociación entre las respuestas al daño y la calidad de las muestras de agua fue observado para los ensayos agudos de las especies empleadas en los ensayos *in vivo* (figura 65). Los índices obtenidos en cuanto a los MN fueron: $r = -0,73$ ($p = 0,274$) en *S. brevipinna*; $r = -0,87$ ($p = 0,126$) en *L. fortunei* y $r = -0,95$ en *C. fluminea*. Sólo en este último grupo de almejas se encontraron valores significativos para dicha asociación ($p < 0,05$). Los índices mencionados corresponden a las respuestas halladas en los granulocitos de los bivalvos, ya que en los hialinocitos se encontraron índices de correlación más bajos sin diferencias significativas ($r = -0,67$ en *L. fortunei* y $r = -0,50$ en *C. fluminea*). Las células CHO-K1 por otra parte, también registraron menores índices de correlación entre MN e ICA ($r = -0,39$; $p = 0,611$).

Las correlaciones establecidas al décimo día de exposición fueron mucho menores en los granulocitos de *C. fluminea*, aproximándose el valor de r a $-0,23$ ($p = 0,773$). Las otras especies mantuvieron un nivel elevado de asociación entre las variables bajo estudio (figura 66).

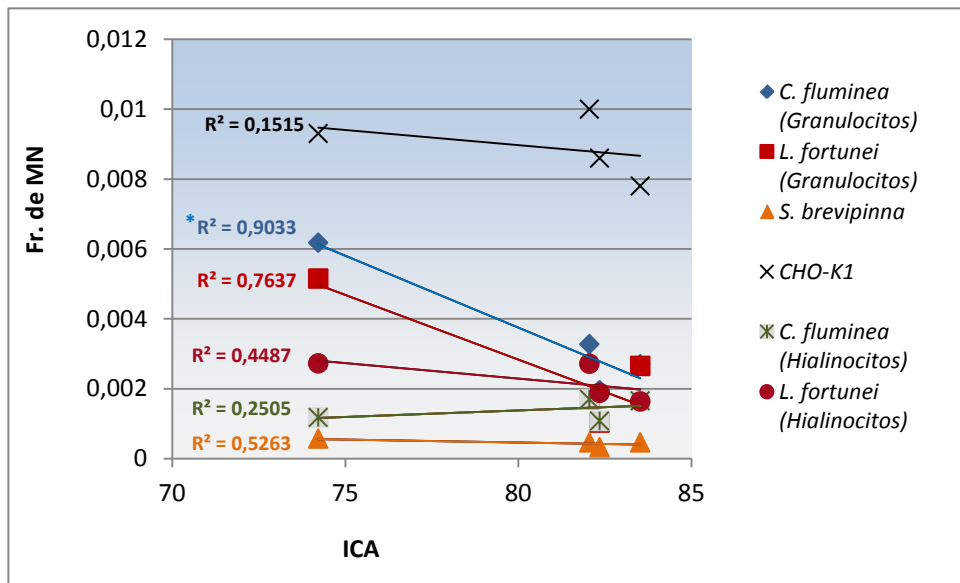


Figura 65. Gráfico de dispersión y líneas de tendencias entre frecuencias (Fr.) de micronúcleos (MN) e índices de calidad de agua (ICA) de los sitios de muestreo al que fueron expuestos ejemplares de *C. fluminea*, *L. fortunei* y *S. brevipinna* en ensayos agudos de 3 días y de 15 h para células CHO-K1 (* $p < 0,05$).

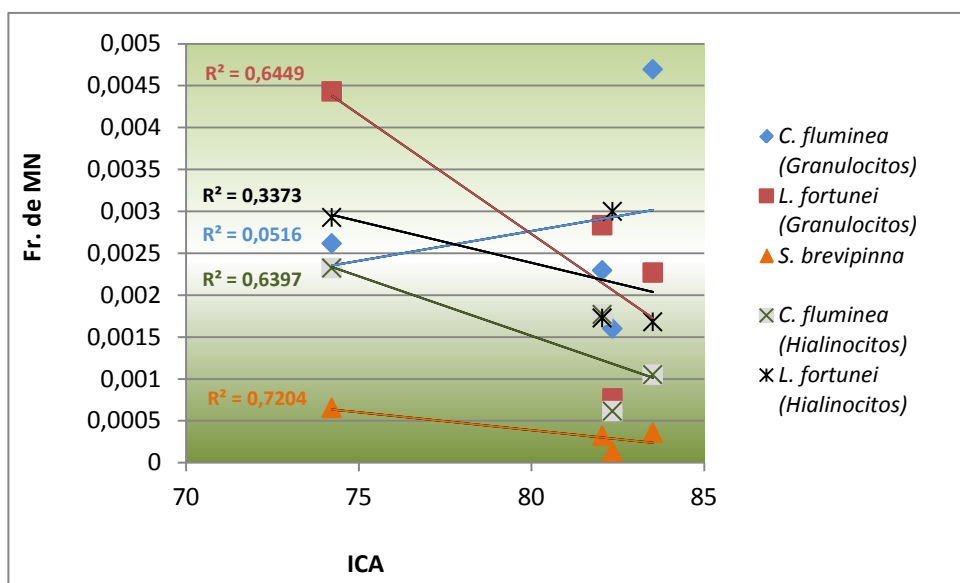


Figura 66. Gráfico de dispersión y líneas de tendencias entre frecuencias (Fr.) de micronúcleos (MN) e índices de calidad de agua (ICA) de los sitios de muestreo al que fueron expuestos ejemplares de *C. fluminea*, *L. fortunei* y *S. brevipinna* durante 10 días.

Las frecuencias de AMN reflejaron un alto grado de asociación con los valores del ICA en cada sitio correspondiente, según los índices obtenidos tanto para los ensayos agudos de 3 días y 15 h respectivamente, como para los ensayos de 10 días de exposición (figuras 67 y 68). Los valores de r estuvieron comprendidos entre -0,78

($p= 0,220$) en las células CHO-K1 y $-0,99$ en *C. fluminea*, con valores altamente significativos de asociación para esta última ($p< 0,01$). Tal como sucedió con los MN, en *C. fluminea* este índice se redujo a valores de $r= -0,50$ ($p= 0,503$) al décimo día de exposición, mientras que en las otras especies estudiadas los índices de correlación se mantuvieron similares y sin diferencias estadísticas significativas.

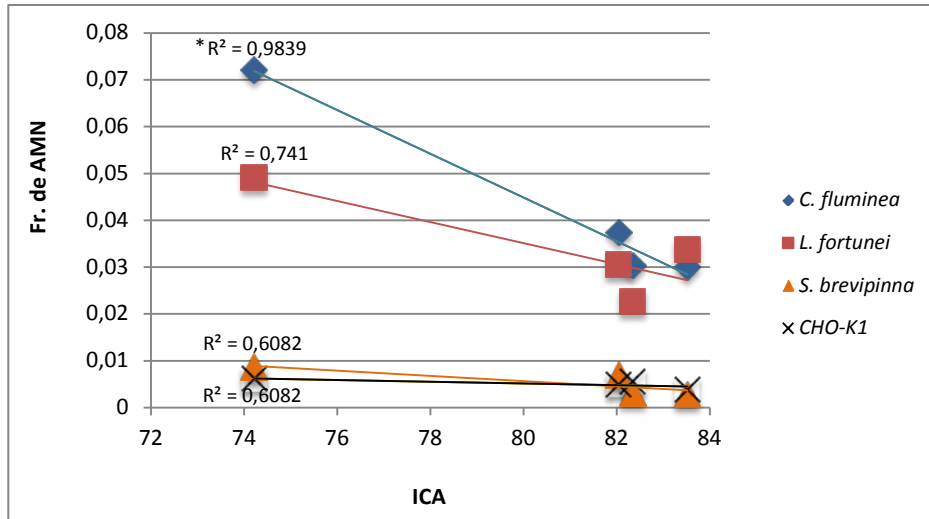


Figura 67. Gráfico de dispersión y líneas de tendencias entre frecuencias (Fr.) de alteraciones de la morfología nuclear (AMN) e índices de calidad de agua (ICA) de los sitios de muestreo al que fueron expuestos ejemplares de *C. fluminea*, *L. fortunei* y *S. brevipinna* en ensayos agudos de 3 días y de 15 h para células CHO-K1 ($*p< 0,01$).

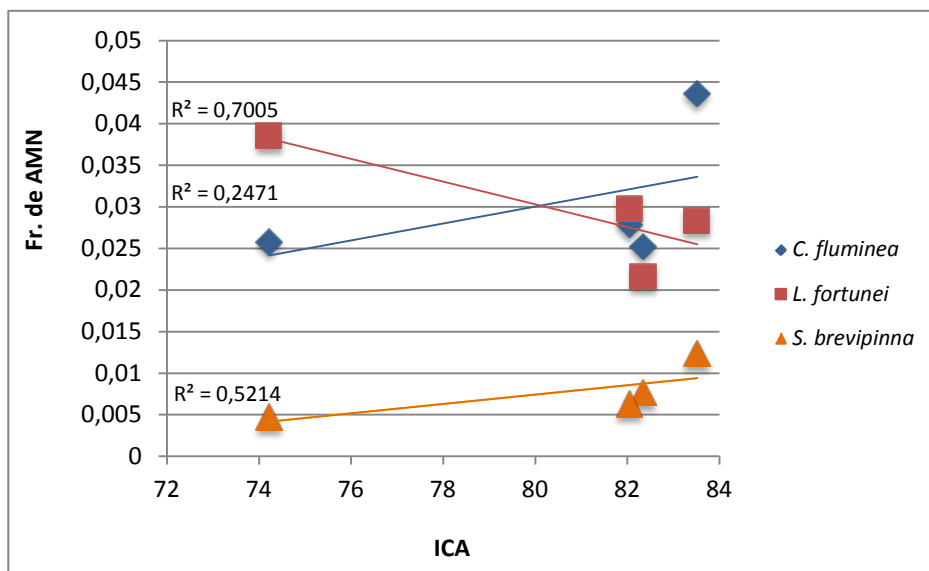


Figura 68. Gráfico de dispersión y líneas de tendencias entre frecuencias (Fr.) de alteraciones de la morfología nuclear (AMN) e índices de calidad de agua (ICA) de los sitios de muestreo al que fueron expuestos ejemplares de *C. fluminea*, *L. fortunei* y *S. brevipinna* durante 10 días.



DISCUSIÓN

La contaminación de los ambientes acuáticos es un problema que ha despertado la atención tanto de la comunidad científica como de los entes regulatorios y el público en general (Ohe *et al.*, 2004). Las grandes cuencas hidrográficas, como la constituida por el río Paraná, son receptoras de numerosos y diversos efluentes de origen industrial, urbano y agrícola. A partir de los mismos, numerosos químicos y xenobióticos contaminantes ingresan a los cuerpos de agua generando mezclas complejas, la gran mayoría con potencialidades mutagénicas y genotóxicas para los organismos acuáticos (Basu y Guha, 2012).

I CARACTERÍSTICAS DEL AREA DE ESTUDIO Y SU RELACIÓN CON LOS EFECTOS GENOTÓXICOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo a partir de los ensayos cometa, de MN y AMN realizados durante el periodo 2009–2011 en diferentes modelos biológicos expuestos a muestras de agua de diferentes sitios del Río Paraná en la Provincia de Misiones, evidencian efectos genotóxicos relacionados con las condiciones de calidad del recurso. De los cuatro sitios seleccionados para el estudio, que abarcan desde Iguazú en el extremo norte de la provincia, siguiendo con Puerto Piray, Puerto Mineral y Posadas en su extremo sur, los mayores niveles de daño en el ADN se registraron luego de la exposición aguda a muestras de agua procedentes de Pto. Piray en los cuatro modelos biológicos empleados: *Corbicula fluminea*, *Limnoperna fortunei*, *Steindachnerina brevipinna* y línea celular CHO-K1. A continuación, el daño genotóxico más elevado se encontró en los tratamientos correspondientes a Pto. Mineral, luego Posadas e Iguazú. No obstante, se observaron variaciones entre los años de estudio respecto a las lesiones en el ADN detectadas con cada técnica dependiendo del tiempo de exposición y de la calidad del agua registrada para cada sitio.

I.1 PUERTO PIRAY Y PUERTO MINERAL:

Las localidades de Pto. Piray y Pto. Mineral se encuentran a la vera del Río Paraná en zonas receptoras de efluentes derivados de industrias de celulosa y papel, lo cual podría explicar los elevados daños genotóxicos encontrados, significativamente superiores al control negativo. El punto de toma de muestra en Pto. Piray se encuentra a pocos metros de la descarga de los efluentes de la papelera, única de las tres industrias de esta índole

ubicadas en un trayecto de tan sólo 200 km sobre el Río Paraná, que utiliza tecnología de cloro elemental (EC) para el blanqueo en la fabricación de papel. Dicha tecnología es considerada obsoleta y la de mayor riesgo potencial para el ambiente y la salud, ya que utiliza entre 50 y 80 kg de cloro por cada tonelada de pulpa de madera blanqueada. Sumado a la liberación de este elemento tóxico y altamente corrosivo, genera derivados contaminantes como dioxinas y furanos, ambos reconocidos por sus efectos antiestrogénicos y negativos para la reproducción, como por sus propiedades persistentes, bioacumulables y carcinogénicas (Fidis, 2007). Si bien no se dispone de datos en la literatura que documenten la presencia de compuestos de este tipo para la zona mencionada, estudios realizados a la altura del Delta del Río Paraná y el Río de la Plata, han mostrado concentraciones elevadas de dioxinas, furanos y PCBs en tejidos de *C. fluminea* y de peces detritívoros (Cataldo *et al.*, 2001; Colombo *et al.*, 2011). A pesar de la carencia de información en relación con estos compuestos, en el presente trabajo las muestras de agua colectadas en Pto. Piray presentaron los menores valores de ICA durante los tres años consecutivos, alcanzando durante el 2011 la categoría de aguas de calidad media. Dentro de los parámetros fisicoquímicos registrados, el pH y la D.B.O se encontraron fuera de los niveles guía permitidos por la legislación vigente para todos los usos del recurso. Otro parámetro para el que no se contemplan valores máximos admisibles pero que superó los valores hallados en los sitios de muestreo restantes fue la conductividad, medida indirecta de sólidos disueltos totales. El N-amoniaco también presentó en Pto. Piray valores que exceden los niveles guía para protección de vida acuática durante los tres años. Con estos datos, es posible deducir que los valores inferiores de calidad de agua para este sitio se ven influenciados por la presencia de los efluentes “crudos” derivados de la industria papelera, ya que la misma no cuenta con sistema alguno para el tratamiento de sus residuos de producción. Tal como se ha demostrado, los denominados “licores” utilizados para degradar la lignina de la madera que están presentes en los efluentes, consisten en soluciones coloidales complejas constituidas por varios componentes inorgánicos y sustancias orgánicas poliméricas como lignina, carbohidratos y sus complejos derivados, cuyas descargas directas han sido responsables de dañar la mayor parte de los ecosistemas de agua dulce (Devi *et al.*, 2011). La presencia de lignina otorga una coloración marrón oscura al agua, similar a la observada en el sitio de toma de muestra de Pto. Piray, que en este caso estuvo acompañada con restos de aserrín. Tanto esta característica como el bajo pH y valores elevados de D.B.O y conductividad, fueron encontrados también en la caracterización fisicoquímica de efluentes de otras industrias

papeleras (Gross *et al.*, 2003; Devi *et al.*, 2011). Estos autores asociaron el bajo pH a la formación de ácidos orgánicos, mientras que la D.B.O y la conductividad elevadas sugieren la presencia de contaminantes iónicos orgánicos e inorgánicos disueltos en gran cantidad.

Klobučar *et al.*, (2010) en un estudio realizado en eritrocitos de peces con muestras de agua de ríos contaminados por papeleras en Croacia, encontraron niveles significativamente elevados en las frecuencias de MN y en el daño al ADN detectados con ensayo cometa en zonas urbanas bajo la influencia de industrias de celulosa y papel. Los valores de pH determinados en dicho trabajo (pH promedio= 8,26) fueron superiores a los hallados aquí, mientras que la D.B.O promedio (4,38) fue inferior. Si se consideran estos parámetros, las muestras de agua colectadas en Pto. Piray se aproximan más a las características propias de los efluentes pasteros que a los cuerpos de agua afectados por su presencia.

En el sitio Pto. Mineral, a diferencia de Pto. Piray, se presentaron variaciones entre los años respecto a la respuesta obtenida en los modelos biológicos. Los daños genotóxicos fueron menos marcados, probablemente por la mayor distancia entre la zona de descarga de los efluentes de la papelera aquí emplazada y el sitio escogido para la toma de muestras (2,3 km aguas abajo). Además, se suma el hecho de que esta industria utiliza para el blanqueo de pasta celulósica tecnología totalmente libre de cloro (TFC), una de las más seguras desde el punto de vista ambiental ya que prescinde del uso del cloro y sus derivados. Los dos factores mencionados podrían explicar el menor impacto registrado en los bioindicadores en esta zona con respecto a Pto. Piray. El ICA general promedio para este sitio refleja buena calidad de sus aguas. El pH fue el único parámetro en exceder los niveles guía permitidos para todos los usos contemplados del recurso durante los años 2010 y 2011. De los restantes parámetros analizados, el N-amoniacal superó los estándares para protección de vida acuática en los mismos años, en tanto los fenoles lo hicieron en el 2011. De esta manera, los efectos genotóxicos encontrados luego de la exposición a muestras de agua de esta localidad, podrían deberse en parte a compuestos residuales derivados de la papelera, ya que la planta de tratamientos líquidos con que cuenta la industria no se encuentra en óptimo estado de funcionamiento. Además, los procesos de blanqueo en estos casos involucran sustancias tales como peróxido de hidrógeno y ozono, el primero de ellos conocido inductor de daño oxidativo en el ADN (Fidis, 2007).

Si se toma en cuenta que esta papelera se ha convertido en una de las más productivas del país en su rubro, con una producción de más de 100.000 toneladas anuales, puede

esperarse que los grandes volúmenes de sus efluentes junto a otros aportes contaminantes en el trayecto del río hasta el sitio de toma de muestras, estén implicados en los efectos genotóxicos observados. Debe considerarse que entre 273 y 455 m³ de agua son requeridos por cada tonelada de papel elaborado, con la consecuente liberación de aproximadamente 300 m³ de aguas residuales. Entre los componentes encontrados en los efluentes de las industrias dedicadas a la fabricación de papel y pulpa kraft como la mencionada aquí, el cobre es uno de los metales pesados que contribuyen con la toxicidad aguda (Devi *et al.*, 2011). Si bien no se incluyó el análisis de metales durante el desarrollo del presente trabajo, se han documentado valores de cobre que exceden los niveles guía para protección de vida acuática en el tramo comprendido aguas abajo de la localidad de Pto. Mineral sobre el curso principal del Río Paraná. Los promedios más elevados para la concentración del metal se registraron a finales de los años 2009 y 2010 (EBY-CECYT-CONICET, 2012; N. Schenone, Comunicación personal, enero 18, 2013).

Adicionalmente, en este sitio la concentración de compuestos orgánicos se encontró entre las más elevadas del estudio. Si bien no fue posible discriminar entre las sustancias registradas, es sabido que muchas de ellas causan daño de diversa índole. Por ejemplo, los hidrocarburos, PCBs y pesticidas han sido asociados con alteraciones endócrinas o disfunción reproductiva, estrés oxidativo y daño en el ADN de peces y moluscos residentes en aguas contaminadas con dichos compuestos (Gross *et al.*, 2003; Ohe *et al.*, 2004). Las aminas y fenoles mostraron efectos tóxicos asociados con inhibición de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE), narcosis y estrés oxidativo (Walker y Schultz, 2003).

La falta de respuesta del Ministerio de Ecología de la Provincia de Misiones ante la solicitud de acceso a los documentos donde se detalla la composición de los efluentes de ambas industrias papeleras, no permitió identificar claramente qué tipo de compuestos podrían asociarse directamente con la afectación del material genético. Sin embargo, durante los últimos 25 años diversas investigaciones que han analizado el efecto de efluentes de industrias de celulosa y papel tanto a campo como en laboratorio, han catalogado a los mismos como mezclas ambientales complejas. En estos casos, identificar los agentes causales del daño observado y establecer las relaciones causa-efecto ha sido un gran desafío debido a que gran parte de los componentes son aún desconocidos. (Gross *et al.*, 2003). Los datos obtenidos a partir de diez estudios realizados con efluentes de este tipo de industrias, han clasificado a los mismos como de elevada genotoxicidad (Houk, 1992; Claxton *et al.*, 1998). Más de 300 compuestos químicos han sido identificados en los efluentes, 3 de ellos con demostradas propiedades carcinogénicas (safrol, tetracloruro de

carbono y cloroformo); 16 considerados como posibles carcinógenos y numerosos mutágenos y clastógenos. Tanto las plantas productoras de papel kraft como de elaboración de papel y pulpa al sulfito liberan efluentes mutagénicos. Los efluentes generados durante la fase de cloración han mostrado ser los más genotóxicos (Houk, 1992; Fidis, 2007). Se ha sugerido que los efluentes finales sin tratamiento no son mutagénicos, presumiblemente debido al hecho de que se diluyen durante su paso por las distintas fases de producción hasta ingresar a los cuerpos de agua (Claxton *et al.*, 1998;). Sin embargo, al igual que en el presente trabajo, también se han demostrado efectos mutagénicos en test de *Salmonella*, efectos citológicos en *Allium* e incrementos en las frecuencias de MN en peces luego de tratamientos con efluentes procedentes de industrias papeleras sin tratamientos (Houk, 1992). Debe agregarse además que los efectos genotóxicos encontrados aquí fueron detectados a partir de muestras de agua tomadas en el curso receptor. Si bien el sitio de muestreo seleccionado se sitúa muy próximo a la zona de descarga de los efluentes, hay que tener presente el potente caudal con que cuenta el río Paraná, con un promedio de 16.097 m³/seg durante los tres años consecutivos. Esto sugiere el potencial mutagénico elevado de las sustancias presentes en los mencionados desechos industriales, ya que a pesar de la capacidad de dilución en un río de tal magnitud como el Paraná, los efectos genotóxicos observados en estos sitios fueron los mayores del estudio.

I.2 IGUAZÚ Y POSADAS:

El agua de los sitios de muestreo Iguazú y Posadas presentó efectos genotóxicos menos pronunciados. Las alteraciones registradas probablemente sean respuestas a desechos y efluentes urbanos, ya que las plantas de tratamiento existentes presentan fallas en su funcionamiento y cubren sólo una parte de la población. Además, no se han registrado industrias localizadas en ambas ciudades dentro del área de estudio que pudieran contribuir en forma directa con el daño observado.

La falta de sistemas de tratamientos de líquidos cloacales es muy común en la mayoría de las localidades de la provincia de Misiones. Sólo recientemente han sido construidas y han comenzado a operar en las principales ciudades, en Posadas en el año 2000 e Iguazú en el año 2011. Previamente, los desechos eran eliminados en crudo al río y actualmente dichas plantas no han optimizado aún su funcionamiento.

Los desechos urbanos están constituidos por acumulación de mezclas complejas provenientes de diversas fuentes como residuos domésticos, comerciales e institucionales,

agua de drenaje y desechos pluviales. Por lo tanto, los volúmenes de descarga hacia los cuerpos de agua son en algunos casos, varios órdenes de magnitud superiores a los industriales (White y Rasmussen, 1998; Ohe *et al.*, 2004). Estudios comparativos han mostrado que mientras el volumen diario de descarga para industrias de celulosa y papel, por ejemplo, es de 10^6 - 10^7 litros, los desechos urbanos de las grandes ciudades rondan los 2×10^9 litros de emisiones diarias (Ohe *et al.*, 2004). Por esta razón, los desechos urbanos son considerados en algunos casos como la fuente dominante de sustancias genotóxicas en aguas superficiales; no sólo por los grandes volúmenes de descarga y la complejidad de compuestos que los constituyen, sino también porque se ha demostrado que los procesos convencionales de tratamiento no siempre consiguen eliminar la genotoxicidad causada por los mismos y en ciertas ocasiones incluso la potencian (White y Rasmussen, 1998).

De todas maneras, debe considerarse que las respuestas de los modelos biológicos ante los tratamientos con aguas de Posadas e Iguazú, presentaron diferencias significativas respecto al control negativo en pocos casos y dependiendo de la técnica empleada, tal como se discutirá posteriormente. El único parámetro que superó los niveles guía para todos los usos recomendados del agua, fue nuevamente el pH. En este caso, se encontró por debajo de los límites aceptables para Posadas en el año 2010 y para Iguazú en el año 2011. Tal como se mencionó para los sitios anteriores, de los restantes parámetros evaluados, los fenoles fueron los únicos en superar los niveles guía de agua para consumo humano y protección de vida acuática en ambos puntos de muestreo y durante los mismos años mencionados.

Por otra parte, la presencia de compuestos orgánicos en las muestras de Posadas mostró ser superior a todas las demás. Iguazú, en cambio, presentó valores intermedios. A pesar de la información disponible acerca de las propiedades fisicoquímicas de algunas genotoxinas presentes en los desechos urbanos y aguas superficiales, su identidad y origen precisos permanecen inciertos. Se estima que una gran parte está constituida por sustancias orgánicas relativamente solubles en agua, capaces de actuar en forma directa sobre el ADN. También se han relacionado algunas aminas aromáticas con la mutagenicidad encontrada en los ríos y desechos municipales; así como los PHAs con propiedades genotóxicas fueron encontrados en aguas sanitarias y de drenaje (White y Rasmussen, 1998). Este tipo de compuestos, por sí solos o en asociación con otros, podrían ser los responsables de los daños genotóxicos observados.

II VARIACIONES TEMPORALES DE LOS BIOMARCADORES Y SU RELACIÓN CON LOS INDICES DE CALIDAD DE AGUA

Considerando todos los sitios de muestreo, los mayores registros de daño en el ADN se obtuvieron durante los últimos años 2010 y 2011 en los modelos biológicos analizados tanto *in vivo* como *in vitro*.

Puerto Piray fue el único sitio en que los ID y frecuencias de MN alcanzaron diferencias significativas respecto al control negativo en todos los organismos y células testeadas durante estos años. Con respecto al año 2009, se obtuvieron diferencias significativas en *C. fluminea*, *S. brevipinna* y en las células CHO-K1 para este sitio, aunque los valores de ID se encontraron por debajo de los obtenidos en los años posteriores.

En cuanto a los demás sitios, Puerto Mineral evidenció valores significativamente superiores al control negativo para ambos biomarcadores en *C. fluminea*, *S. brevipinna* y células CHO-K1 en los años 2010 y/o 2011. *L. fortunei* sólo mostró dichas diferencias para el test de MN y AMN. En Posadas se presentó una situación similar a la descrita para Pto. Mineral. La única diferencia radicó en que el ensayo cometa no mostró diferencias estadísticas significativas en las células CHO-K1 tratadas *in vitro*. Además, durante el año 2009 las AMN tanto en *C. fluminea* como *L. fortunei* superaron las frecuencias de alteraciones nucleares encontradas en el control negativo.

Finalmente, los tratamientos con aguas de Iguazú también mostraron respuestas significativas al daño, aunque menos frecuentes. Estas respuestas se dieron principalmente durante el año 2011 para los ID en células CHO-K1, los MN en *C. fluminea* y las AMN en todos los modelos biológicos.

Los mayores daños observados en los años 2010 y 2011 se corresponden, de hecho, con la disminución de los valores de ICA en cada uno de los sitios de muestreo respecto a los obtenidos para el año 2009. Esta tendencia progresiva hacia índices de calidad de agua inferiores fue mucho más marcada en los sitios ubicados al norte de la provincia, es decir, Iguazú y Pto. Piray, para los cuales los niveles del río descendieron en el último año. El hecho de que en Pto. Mineral y Posadas los ICA no hayan presentado diferencias significativas en los años 2010 y 2011, podría atribuirse al hecho de que durante el 2011 la Represa Hidroeléctrica Yacyretá produjo un incremento de la cota del Río Paraná en Posadas, elevando los niveles del mismo en un trayecto de 140 km aguas arriba, hasta prácticamente alcanzar la altura correspondiente a la localidad de Pto. Mineral. Los

elevados niveles del río que igualaron el nivel en ambos sitios, junto a los mayores caudales registrados en los dos últimos años del estudio, pueden haber causado una mayor dilución de los compuestos encontrados en estas zonas y repercutir así en el cálculo de los ICAs. A pesar de ello, la mejora en la calidad del índice no se reflejó en los biomarcadores analizados. Tal como fuera sugerido por Jha (2004), esto puede explicarse por el hecho de que los efluentes urbanos e industriales están compuestos en su mayoría por mezclas contaminantes complejas cuya capacidad genotóxica y/o mutagénica resulta difícil de predecir. Además, interacciones que pueden ocurrir con otras sustancias luego de su ingreso a los cuerpos de agua, pueden generar efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos. Por lo tanto, el empleo de técnicas de caracterización química en forma aislada, no permite evaluar adecuadamente la toxicidad de los efluentes sobre la biota (Mozeto y Zagatto, 2006; Bolognesi & Hayashi, 2011).

Tal como se mencionó anteriormente, Puerto. Piray evidenció los mayores efectos genotóxicos y simultáneamente, las muestras de agua en este sitio mostraron los índices más bajos de calidad de agua. La menor respuesta observada durante el año 2009 frente a estos tratamientos, se debe probablemente a que la planta de celulosa y papel ubicada en esta zona se encontraba inactiva durante el muestreo realizado en ese año. Esto es factible dado que los ICAs en los años 2009 y 2010 se mantuvieron casi sin variaciones a pesar de que el daño detectado en el ADN durante el 2010, se encontró entre los más elevados de la serie. La clausura temporaria de la industria mencionada por parte del Ministerio de Ecología de la provincia de Misiones, da cuenta de las irregularidades que atraviesa la empresa por su infracción a la Ley 24.051 de residuos peligrosos.

Durante el desarrollo de los controles negativos, no se registró mortalidad de ninguno de los ejemplares expuestos *in vivo*. De hecho, la evaluación del estrés asociado con la manipulación de los ejemplares en los bioensayos, no mostró diferencias significativas en los ID y en las frecuencias de MN y AMN en organismos expuestos a sucesivas extracciones de muestras biológicas. En los peces, además, el número elevado de eritroblastos encontrados luego de someter a los individuos a tomas repetidas de muestras, indica una buena fisiología de los mismos. Por lo tanto, la mortalidad observada en las tres especies durante los tratamientos con aguas de Pto. Piray, Pto. Mineral y Posadas identificados únicamente en los años 2010 y 2011, estarían relacionados a las condiciones de calidad del agua. Estudios de laboratorio han demostrado que la interacción entre oxígeno disuelto y amonio cambia la fisiología respiratoria de peces de agua dulce. El exceso de amonio en su forma iónica y no iónica es tóxico para los organismos acuáticos,

ocasionando deterioro cerebral en peces (Ho *et al.*, 2012). En este trabajo, los peces fueron de hecho los más afectados y cabe destacar que el N-amoniaco en los tres sitios, superó los límites permitidos para protección de vida acuática, siendo más elevados en Pto. Piray y Posadas donde se registraron los mayores porcentajes de mortalidad. A esto debe agregarse que la concentración de compuestos orgánicos y fenoles también fue elevada para Posadas.

Resulta interesante que durante el año 2010 se obtuvieran los registros más elevados de daño en el ADN por medio de ambas técnicas, ya que si bien es aquí cuando se reflejaron los menores ICA de los tres años en todos los sitios, también se presentaron los mayores caudales anuales. Y aunque esto podría sugerir una capacidad de dilución importante de los contaminantes con potencialidad mutagénica o genotóxica presentes en el cuerpo de agua, se ha sugerido que el incremento del flujo de los ríos como consecuencia de las lluvias, puede actuar como agente lixivante. De esta manera, remueve sustancias del suelo hacia el agua como los PHAs y moviliza sedimentos que se tornan así biodisponibles para ingresar a la cadena trófica (Osório *et al.*, 2013). Esta situación puede ser relevante si se considera la cuenca del Río Paraná en su conjunto, donde el flujo del río arrastra grandes cantidades de sustancias contaminantes desde su paso por importantes centros urbanos e industriales de Brasil y donde también se asientan numerosas represas de su tramo superior. Situaciones como ésta que se dan principalmente en compuestos orgánicos con capacidad de fijarse a los sedimentos y luego bioacumularse en los tejidos de organismos acuáticos, pueden explicar el incremento observado en la concentración de compuestos orgánicos a lo largo del trayecto del río desde Iguazú hasta Posadas. La excepción dada por Puerto. Piray, donde las sustancias orgánicas cuantificadas fueron las menores, puede deberse al punto de toma de muestra muy próximo a la descarga de los efluentes de la papelera y algo alejado del río abierto. De todas maneras, no se observó un gradiente de daño a través del curso del río tal como se comentó para los compuestos orgánicos. Algunos autores sugieren que el flujo puntual de descarga de contaminantes principalmente en las proximidades de industrias y plantas de tratamientos urbanos, son los responsables de la ausencia de dicho gradiente de contaminación (Vargas *et al.*, 1988; Osório *et al.*, 2013).

III ENSAYOS *IN VIVO*

III.1 VARIACIONES EN LOS BIOMARCADORES ASOCIADAS A LOS TIEMPOS DE EXPOSICIÓN

Los efectos genotóxicos y mutagénicos detectados mediante ensayo cometa, test de MN y AMN, se manifestaron claramente al cabo de los ensayos agudos realizados *in vivo* durante 72 h (3 días) de exposición.

Estos resultados coinciden con lo registrado en un estudio realizado con peces trasplantados a ríos contaminados, donde se observaron incrementos significativos en las frecuencias de MN y AMN al tercer día de exposición en relación al control negativo (Kushwaha *et al.*, 2012). También fueron encontrados elevados índices de daño detectados por ensayo cometa en la especie *Prochilodus lineatus* expuestos a muestras de agua contaminadas con plomo (Pb) entre las 24 y 96 hs (Monteiro *et al.*, 2011). Al-Sabti y Metcalfe (1995) en una revisión de la literatura donde distintas especies de peces fueron evaluadas por su exposición a compuestos mutagénicos luego de 1 a 56 días, determinaron que la máxima inducción de MN se manifiesta típicamente entre 1 y 5 días posteriores a los tratamientos.

Los resultados obtenidos para los bioensayos realizados durante 10 días presentaron algunas diferencias dependientes de las técnicas y las especies seleccionadas. En términos generales, puede decirse que se observó una reducción del daño en el ADN entre el tercero y décimo día de exposición. Adicionalmente, tomando en cuenta los distintos tipos de AMN encontrados en los tres bioindicadores, en todos los casos las gemaciones (*buds*) y los núcleos lobulados (*lobed*) fueron los más frecuentes en todos los tratamientos tanto para las exposiciones agudas como subcrónicas.

En general, al igual que en los ID estimados para ensayo cometa, se presentaron frecuencias reducidas de MN y AMN al décimo día, principalmente luego de los tratamientos agudos que presentaron mayores frecuencias de daño. Las principales variaciones en las frecuencias de MN y AMN se vieron particularmente en los bivalvos de ambas especies de acuerdo al tipo celular analizado, ya sean hialinocitos o granulocitos, tal como se discutirá posteriormente.

Los únicos sitios en mostrar incrementos en las frecuencias de MN entre el tercero y décimo día de exposición, tanto en peces como en bivalvos de la especie *L. fortunei*, fueron Puerto. Piray y Posadas. En dos casos particulares ocurridos en granulocitos de *C.*

fluminea y eritrocitos de *S. brevipinna*, los incrementos de MN observados al décimo día de exposición con aguas de Puerto Piray se vieron en el año 2009. Los otros casos donde se registraron aumentos del daño en función del tiempo de exposición, se dieron durante los años 2010 y 2011.

Resultados similares a los encontrados aquí se obtuvieron con estudios realizados en bivalvos de la especie *Perna viridis* expuestos a distintas concentraciones del químico benzo [*a*] pireno durante 1, 3, 6 y 12 días. En este caso, las menores concentraciones del compuesto exhibieron incrementos significativos en los ID detectados con ensayo cometa respecto al control negativo, solamente luego de 3 días de exposición. A partir del sexto día, los parámetros regresaron a los valores basales. Las concentraciones más elevadas del químico, sin embargo, mostraron daño acumulativo en el ADN con el transcurso del tiempo. Lo mismo ocurrió con las frecuencias de MN y AMN estimadas por Siu *et al.* (2004).

Podría proponerse entonces que la mayor parte de los contaminantes responsables del daño observado en el río Paraná, se encuentren en bajas concentraciones y actúen de manera directa provocando daño potencialmente reparable. El ensayo cometa tiene la potencialidad de detectar roturas en las cadenas de ADN que representan el efecto directo de agentes genotóxicos cuyos daños resultan rápidamente reparables, o bien pueden ser intermediarios en el proceso de reparación celular (Collins, 2004; Collins *et al.*, 2008). Esto podría explicar la reducción de los ID observados entre el tercero y décimo día de exposición en los organismos expuestos. Sin embargo, algunos autores atribuyen la reducción de migración del ADN en los cometas a la inducción de entrecruzamientos (*cross-links*) entre cadenas de ADN o de compuestos con capacidad de interactuar con dicha molécula (Bolognesi *et al.*, 2004).

También podría ocurrir pérdida de la acción genotóxica a causa de la descomposición, evaporación o dilución de los contaminantes presentes en las muestras de agua, ya que se establecieron ensayos estáticos sin recambio del agua de los tratamientos durante el periodo completo de exposición.

El incremento del daño observado en función del tiempo de exposición a muestras de agua de Puerto Piray y Posadas, principalmente detectados mediante el test de MN y AMN, podría deberse a que en dichas muestras las sustancias responsables de generar estas alteraciones nucleares se encuentren a elevadas concentraciones con la potencialidad de actuar a nivel de la maquinaria de división celular, interfiriendo con la formación del huso mitótico, con la unión de los cromosomas al mismo; o bien que hayan escapado a los

mecanismos de reparación celular. Es decir, estarían actuando sustancias clastogénicas y aneugénicas que requieren de ciclos de división celular para expresar el daño, principal blanco de detección de estas técnicas (Natarajan, 2002; Çavaş y Gözükar, 2005; Utani *et al.*, 2010). Gran parte de las sustancias contaminantes en estos sitios podrían persistir en el agua y/o bioacumularse en los organismos hasta provocar el efecto observado, ya que la toxicidad de ciertos efluentes depende de la concentración y tiempo de exposición. Un caso estudiado en peces de la especie *Heteropneustes fossilis* sometidos a diferentes concentraciones de efluentes de industrias de celulosa y papel, mostró que a mayores concentraciones de dichos efluentes se incrementaban las frecuencias de MN y AMN a través del tiempo entre 10 y 60 días (Basu y Guha, 2012).

III.2 VARIACIONES EN LOS BIOMARCADORES ASOCIADAS A LOS DISTINTOS TIPOS DE HEMOCITOS EN BIVALVOS

La presencia de distintos tipos celulares en la hemolinfa de moluscos ha sido reconocida por varios autores y si bien existen discrepancias en cuanto a su clasificación e identificación, se han reconocido dos subpoblaciones principales de hemocitos: hialinocitos y granulocitos (González y Arenas, 2002; Chang *et al.*, 2005; Jamili *et al.* 2009). En los moluscos bivalvos, los hemocitos cumplen importantes funciones en los mecanismos de defensa innata, además de participar en otros procesos como reparación de tejidos, digestión de nutrientes, transporte y excreción. En *C. fluminea* por ejemplo, se ha determinado actividad citotóxica en los componentes de la hemolinfa (González y Arenas, 2002). Debido a que la hemolinfa constituye la mayor parte del tejido blando en bivalvos y a que los hemocitos son las células circulantes del sistema vascular abierto, se encuentran constantemente expuestas a los contaminantes presentes en los cuerpos de agua. Esto sumado a las funciones inmunológicas mencionadas y a la facilidad en la obtención de suspensiones celulares mediante una metodología no invasiva para su extracción, hace que dicho tejido sea de elección cuando se desean evaluar efectos mutagénicos y genotóxicos de contaminantes ambientales (Bolognesi y Hayashi, 2011).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que los granulocitos respondieron de manera más intensa al daño que los hialinocitos, encontrándose en términos generales frecuencias más elevadas de MN y AMN para los primeros. Las excepciones se vieron durante el año 2010, donde el total de los tratamientos realizados en *C. fluminea* mostró incrementos de estas alteraciones en la subpoblación celular de los

hialinociros entre el tercero y décimo día de exposición. En *L. fortunei*, por otra parte, se presentó una situación única en estos hemocitos agranulares, donde las frecuencias de MN halladas al décimo día de exposición con aguas de Iguazú en el año 2011, fueron las más elevadas de toda la serie de datos. A pesar de ser una situación llamativa la observada para este sitio, donde las condiciones generales de calidad de agua se encontraron entre las mejores, también cabe destacar que durante el 2011 se presentó un descenso muy marcado en el ICA. De hecho, durante este año, el índice de calidad para Iguazú fue inferior al de Puerto Mineral y Posadas. Hay que considerar que esta localidad está situada en zona de frontera con los países Brasil y Paraguay, desde donde se liberan masivamente efluentes urbanos sin tratamiento al Río Paraná. Por lo tanto, es posible que la respuesta observada se deba a una elevada sensibilidad de los hialinocitos ante condiciones ambientales cambiantes y/o ante la presencia de xenobióticos en grandes concentraciones, principalmente aquellos capaces de persistir en los cuerpos de agua. Además, cabe destacar que tanto en los bioensayos agudos como semi-crónicos llevados a cabo en los tres bioindicadores, también se registraron durante 2010 y 2011 frecuencias significativamente superiores de MN y AMN en Iguazú respecto al control negativo. En ambos casos, coincidentes con descensos en los ICAs.

La mayor respuesta al daño encontrada en los granulocitos respecto de los hialinocitos, tiene que ver presumiblemente con que los primeros han sido asociados a una mayor capacidad fagocítica y a propiedades antigénicas (Cajaraville y Pal, 1995; Carballal *et al.*, 1997). De hecho, en los casos en que se presentó contaminación en los extendidos de hemolinfa, en numerosas ocasiones se observó a los granulocitos rodeados por bacterias. Por lo tanto, serían las células responsables del primer contacto y reacción frente a xenobióticos. Resultados similares fueron obtenidos por Dolcetti y Venier (2002) en mejillones marinos residentes en ambientes receptores de efluentes industriales. En este caso, hallaron incrementos significativos de MN en granulocitos respecto a los controles y valores significativamente menores en hialinocitos, acompañados de notables aumentos en las AMN. En base a estos datos, sugirieron inhibición de la replicación celular causada por la presencia de agentes tóxicos.

Las células multinucleadas, en su mayoría binucleadas, son consideradas producto de efectos mutagénicos y/o genotóxicos causados por determinadas sustancias. Tal es el caso de lo observado en granulocitos y células branquiales de bivalvos, como en eritrocitos de peces (Izquierdo *et al.*, 2003; Venier y Zampieron, 2005; Souza y Fontanetti, 2006; Costa y Costa, 2007; Baršienė *et al.*, 2008; Baršienė *et al.*, 2013). No obstante, en el

presente trabajo se registró un porcentaje proporcionado y elevado de hialinocitos multinucleados (binucleados, trinucleados y tetranucleados) en todos los tratamientos realizados con ambas especies de bivalvos, incluso en los controles negativos. Efectivamente, se observó una relación inversa entre las frecuencias de MN y las frecuencias de estos hialinocitos multinucleados, más evidente en *C. fluminea*. En los tratamientos donde el número de MN contabilizados fue menor, se incrementaron las frecuencias de estas células. En concordancia con lo sugerido por Pampanin *et al.* (2002), los hemocitos diferenciados pueden retener la capacidad de dividirse, soportando la hipótesis de que los granulocitos y hialinocitos corresponden a poblaciones celulares independientes. Por ello, esta propiedad se vería disminuida ante condiciones ambientales desfavorables. Otros autores sugieren que los hialinocitos serían hemocitos en estadios de diferenciación temprana, que derivan en granulocitos. Se fundamentan para ello en las características indiferenciadas que presentan a nivel ultraestructural (Carballal *et al.*, 1997).

III.3 ENSAYOS DE RECUPERACIÓN DE DAÑOS: CAPACIDAD DE REPARACIÓN DEL ADN Y POSIBLES RESPUESTAS ADAPTATIVAS

Los ensayos de recuperación de daños realizados en los tres modelos biológicos *in vivo* luego de la exposición tanto de 3 como 10 días a las muestras de agua de Puerto Piray y Puerto Mineral, reflejaron reversión de dichos daños detectados mediante ensayo cometa y test de MN y AMN. En los bivalvos, dichos efectos se hicieron evidentes al alcanzar el máximo tiempo de recuperación al que fueron sometidos, es decir 10 días para ambos tratamientos. Estudios de reparación de daños en el ADN inducidos por Metilmetanosulfonato (MMS) en *C. fluminea* concuerdan con estos resultados, donde el máximo nivel de recuperación se alcanzó al noveno día y se mantuvo estable hasta el día 30 (Rigonato *et al.*, 2005). En los peces, sin embargo, este comportamiento se manifestó claramente para el ensayo cometa y las AMN al cabo de 10 días de recuperación para Puerto Piray y 15 días para Puerto Mineral. Los MN incrementaron sus frecuencias, sugiriendo que la capacidad de detoxificación y/o reparación del ADN en la especie *S. brevipinna* es reducida en relación a la de los bivalvos. Es sabido que en comparación con los mamíferos, la capacidad de reparación del ADN en peces es baja (Mitchelmore y Chipman, 1998). Adicionalmente, estos organismos podrían acumular con mayor eficacia ciertos compuestos con capacidad de alterar los mecanismos de división celular, evidentes

por el aumento en el número de células con núcleos en forma de ocho y células binucleadas. A su vez, estudios realizados por Furnus *et al* (en prensa) en varias especies nativas de peces analizadas *in situ* en el Río Paraná., mostraron que *S. brevipinna* presentó las frecuencias más elevadas de MN y AMN debido probablemente a que su hábito alimentario detritívoro y su particular estructura intestinal en espiral, le proporcionan mayor área de superficie para la absorción de sustancias lipofílicas presentes en los sedimentos. Esta información resulta de gran relevancia teniendo en cuenta que *S. brevipinna* constituye una especie nativa de la cuenca del Río Paraná y puede verse afectada por las alteraciones en su entorno a causa de la contaminación.

De todas maneras, debe tenerse en cuenta la potencial reversión de los daños en el ADN originados por este tipo de efluentes, considerando que el uso de tratamientos secundarios en industrias de celulosa y papel ha logrado reducir la genotoxicidad de los mismos en varios órdenes de magnitud (Claxton *et al.*, 1998).

Es importante resaltar que ambas especies de bivalvos aquí utilizadas, poseen características propias de especies introducidas y como tales, sus propiedades para adaptarse rápidamente a nuevos ambientes pueden estar relacionadas con las respuestas observadas ante los tratamientos y los ensayos de recuperación respectivos. Las características morfo funcionales de estos bivalvos les han permitido una rápida expansión y la plasticidad genética representa un factor potencialmente involucrado. *Corbicula fluminea* ha sido encontrada por ejemplo en zonas de elevada contaminación de la provincia de Buenos Aires (Darrigran y Coppola, 1994). Asimismo, esta especie ha mostrado una notable capacidad de reversión de daños en el ADN detectados mediante ensayo cometa luego de 6 hs de exposición a fracciones solubles de gasolina (Fedato *et al.*, 2010). Se ha demostrado desde hace tiempo que la contaminación antropogénica puede actuar como una fuerza selectiva, ilustrando el principio de “evolución a través de la contaminación”. Este principio requiere una marcada plasticidad y variabilidad genética entre organismos (Straalen *et al.*, 2011). Si bien este factor no fue evaluado en el presente trabajo, puede decirse que la notable variabilidad interindividual encontrada en *C. fluminea* y *L. fortunei* ante los tratamientos, reflejada por los elevados desvíos estándar (DE) en los ID, podría ejemplificar la versatilidad de estas especies. Los DE determinados en peces fueron inferiores, sugiriendo una respuesta más homogénea ante los tratamientos.

De las dos especies de moluscos, no obstante, *L. fortunei* mostró mayor nivel de tolerancia y resistencia frente a ambientes contaminados. Fue además la especie con menor porcentaje de mortalidad registrado en los tratamientos y no se encontraron en los

extendidos de hemolinfa células apoptóticas, a diferencia de lo ocurrido con *C. fluminea* y *S. brevipinna*. Actualmente, es considerada una especie con características invasoras de alto impacto y su presencia fue detectada en los últimos años incluso en el sitio de toma de muestras de Posadas. En comparación, para *S. brevipinna* el porcentaje de mortalidad durante el 2011 fue del 100 % luego de la exposición con aguas de este sitio. Por lo tanto, la tolerancia y la capacidad adaptativa ante condiciones desfavorables del entorno en el mejillón dorado, podrían enmascarar los efectos en sitios contaminados y ser limitantes en su elección como especie bioindicadora cuando se desean establecer programas de monitoreo ambiental a nivel de cuencas como la del Río Paraná.

IV ENSAYOS *IN VITRO*: ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE LOS BIOMARCADORES EN CÉLULAS CHO-K1

Las respuestas al daño detectadas a través de ambos biomarcadores (ensayo cometa y test de MN) en células CHO-K1 expuestas a muestras de agua del Río Paraná, fueron similares a las encontradas en los bioensayos de exposición aguda con peces y moluscos. Tanto los ID en el ADN como las frecuencias de MN más elevadas se manifestaron durante los dos últimos años del estudio (2010 y 2011), asociados con una menor calidad del agua tal como se reflejó en los valores inferiores de los ICAs. Nuevamente, Puerto Piray constituyó el único sitio en mostrar diferencias significativas respecto al control negativo durante los tres años consecutivos para el ensayo cometa. Con esta técnica, solamente se hallaron ID significativamente elevados en relación al control negativo para Iguazú en células CHO-K1 (año 2010) y en eritrocitos de *S. brevipinna* (año 2011). En relación con el test de MN, únicamente durante el año 2011 se hallaron frecuencias estadísticamente elevadas para los tratamientos realizados con aguas de todos los sitios de muestreo, siendo muy marcadas las diferencias halladas en los dos primeros sitios de la serie, Iguazú y Pto. Piray. Sólo para Pto. Mineral se observaron frecuencias elevadas de MN también en el año 2010. En relación con las AMN, si bien se observaron notables incrementos de dichas frecuencias durante los años 2010 y 2011, en coincidencia con los elevados daños genotóxicos observados para este mismo periodo, no se alcanzaron diferencias significativas respecto al control negativo en ningún caso. Al igual que en los ensayos *in vivo*, las gemaciones se encontraron entre las AMN más frecuentes y con porcentajes relativamente equitativos de distribución entre los tratamientos. La diferencia estuvo dada sin embargo por los puentes cromatínicos, otra de las alteraciones analizadas.

Si bien sólo el 10% del total de las AMN encontradas se relacionó con este tipo de alteraciones, los tratamientos con aguas de Puerto Piray y Puerto Mineral mostraron porcentajes elevados de las mismas en relación con los demás tratamientos. Esto sugiere la presencia de sustancias contaminantes con propiedades clastogénicas en ambas muestras de agua, ya que dichos agentes han sido asociados con la presencia de puentes nucleoplásmicos originados posiblemente a partir de cromosomas dicéntricos en los cuales ambos centrómeros son atraídos hacia polos opuestos durante la anafase (Fenech, 2000). A su vez, los cromosomas dicéntricos pueden generarse por errores en la reparación de roturas cromosómicas, por la fusión de extremos teloméricos o bien por una separación defectuosa de las cromátides hermanas durante anafase. Por tal motivo, los puentes cromatínicos han sido reconocidos como biomarcadores adicionales de inestabilidad cromosómica (Fenech *et al.*, 2011).

Si bien este modelo celular (CHO-K1) se utiliza indirectamente para testear los efectos en mamíferos, sin la complejidad que implica el manejo de organismos vivos, la inducción de mutaciones en cultivos celulares no representa necesariamente los eventos ocurridos en los organismos propiamente dichos. Los mecanismos de incorporación y bioacumulación; las vías enzimáticas encargadas del metabolismo y detoxificación, así como la reparación del ADN, se consideran diferentes (Zeeland *et al.*, 2001). Por lo tanto, la extrapolación de los resultados obtenidos debe ser cautelosa.

El recuento de células en metafase para la elaboración del índice mitótico (IM) como medida de la citotoxicidad, presenta gran ventaja. A diferencia de los organismos empleados como bioindicadores, donde además de presentar cromosomas pequeños y en gran número, las figuras mitóticas son muy difíciles de observar, en las células CHO las distintas fases de división celular son fácilmente identificables. Además, las variaciones en los IM mostraron clara relación con la calidad de las muestras de agua evaluadas, donde bajos IM se asociaron a daños elevados en el ADN. Adicionalmente, el recuento de células apoptóticas como medida complementaria de la citotoxicidad, mostró clara relación con los biomarcadores y el ICA. Los mayores porcentajes de células apoptóticas se presentaron en los sitios que reflejaron mayor daño genotóxico y a la vez menor calidad de sus aguas. Siguiendo las recomendaciones internacionales para el desarrollo del test de micronúcleos *in vitro*, las células CHO han mostrado ser un modelo apropiado y eficiente para la detección de efectos genotóxicos a través de esta técnica ya sea con o sin la incorporación de citocalasina B y siguiendo distintos tiempos de exposición a las muestras de interés (Lorge *et al.*, 2006; OECD, 2010). En el presente trabajo, la aplicación del test de MN *in*

in vitro sin citocalasina B y con tiempos de exposición a los tratamientos de al menos un ciclo en células CHO-K1 sin periodo posterior de recuperación, permitió la detección de efectos genotóxicos relacionados con sustancias potencialmente clastogénicas y aneugénicas que pudieran estar presentes en las muestras de agua. Tal como se ha demostrado en estudios previos, esta metodología resulta adecuada y eficaz cuando se trabaja principalmente con muestras ambientales complejas, donde ciertos agentes químicos requieren de tiempos prolongados de exposición para que el efecto sea evidente; mas aún cuando se trabaja en ausencia de factores de activación metabólica como el S9 mix (Kirsch-Volders *et al.*, 2003; Aardema *et al.*, 2006).

Las ventajas de este tipo de ensayos *in vitro*, que ha cobrado relevancia en la detección de agentes con potencialidades aneugénicas presentes en muestras y desechos ambientales, se debe principalmente a la facilidad de manejo del material y el corto tiempo requerido para los tratamientos (Reifferscheid *et al.*, 2008). Trabajos realizados mediante tratamiento *in vitro* de estas células con muestras de agua provenientes de tres localidades brasileñas del estado de São Paulo contaminadas con metales pesados, han mostrado también una respuesta elevada con ensayo cometa respecto al control negativo (Matsumoto *et al.*, 2003). La metodología empleada fue la misma que la desarrollada en este trabajo, destacando su utilidad para evaluaciones genotóxicas de muestras ambientales. Resultados similares fueron obtenidos en estudios preliminares de la evaluación de genotoxicidad de aguas del río Paraná en el norte de la provincia de Misiones *in vivo* (*C. fluminea*) e *in vitro* con células CHO-K1 (Caffetti *et al.*, 2008).

V ANÁLISIS GENERAL

El análisis comparativo general entre los distintos modelos estudiados tanto *in vivo* como *in vitro*, reveló respuestas positivas con ambos biomarcadores. El ensayo cometa brindó resultados más homogéneos entre las especies que el test de MN y AMN en relación con el daño en el ADN observado. Los ID obtenidos con la técnica de cometa fueron similares en todos los modelos biológicos, encontrándose para el sitio Pto. Mineral mayor variabilidad en respuesta al daño. En relación a las frecuencias medias de MN y AMN estimadas para el periodo completo de estudio (2009-2011), se observaron diferencias estadísticas significativas respecto a los controles para los sitios de menor calidad de sus aguas. Los bivalvos de ambas especies presentaron respuestas similares al daño con esta técnica y en términos comparativos, frecuencias de MN más elevadas que

los peces. A su vez, las frecuencias de MN estimadas en las células CHO-K1 tratadas *in vitro*, fueron muy superiores a las observadas en los tres bioindicadores. Independientemente, tanto en eritrocitos de peces como en hemocitos de bivalvos y en células CHO-K1, los diferentes tamaños de micronúcleos encontrados sugieren la presencia de sustancias con capacidad clastogénica y/o aneugénica en las muestras de agua evaluadas.

Es posible que en su gran mayoría los contaminantes responsables del daño observado en los bioindicadores propuestos, tengan acción directa sobre el ADN. Esto puede reflejarse en los ID elevados y significativos respecto al control, detectados mediante el ensayo cometa para la mayoría de los sitios estudiados y en todos los modelos biológicos. Entretanto aquellas sustancias con propiedades clastogénicas y aneugénicas detectadas mediante el test de MN, es posible que actúen de manera más efectiva en las células CHO debido a su exposición directa. Cabe destacar que tanto las frecuencias de MN en los tratamientos como también en los controles negativos en estas células, fueron las más elevadas de la serie. Hay que tener en cuenta que las líneas celulares como la CHO-K1 pueden manifestar inestabilidad genómica elevada (Xu *et al.*, 2012)

A diferencia de los MN, los resultados obtenidos para las AMN mostraron frecuencias medias más elevadas en los moluscos bivalvos, con diferencias significativas entre los sitios de menor ICA y el control negativo únicamente en las almejas *C. fluminea*. Las frecuencias de AMN en los peces y células CHO-K1 fueron inferiores y similares entre sí. Los tratamientos *in vitro* con aguas de Pto. Piray en el análisis general, consituyeron el único sitio para el cual las células CHO-K1 mostraron diferencias estadísticas de las AMN respecto al control. En la mayoría de los casos, el incremento en dichas anomalías se asoció a incrementos correlativos en las frecuencias de MN. La misma correlación entre MN y AMN ha sido determinada en estudios *in situ* con peces residentes en ambientes acuáticos contaminados (Ergene *et al.*, 2007; Seriani *et al.*, 2011).

El origen preciso de las AMN permanece aún incierto, pero se ha sugerido que representan una respuesta primaria, previa a la formación de los MN (Ayllon y Garcia Vasquez, 2000; Mallick y Khuda-Bukhsh, 2003). Varios autores proponen que una vez que la célula detecta una región afectada, comienza un mecanismo de reparación y eliminación de la cromatina dañada. Dicha cromatina se desplaza hacia la periferia del núcleo y es entonces eliminada por exocitosis. Por lo tanto, antes de su completa eliminación, la membrana nuclear puede presentar imperfecciones características de las AMN (Fenech *et al.*, 2003; Mallick y Khuda-Bukhsh, 2003; Seriani *et al.*, 2011).

En este aspecto, los dos tipos de AMN encontrados con mayor frecuencia luego de la exposición a muestras de agua del Río Paraná (gemaciones y núcleos lobulados), reciben particular atención. Problemas durante la unión cromosómica al huso mitótico y su posterior segregación, o fenómenos de amplificación génica generados a través de ciclos de ruptura del ADN, fusión y puente, podrían llevar a la formación de núcleos lobulados, globulares y gemaciones durante la eliminación del ADN amplificado desde el núcleo (Ergene *et al.*, 2007; Fenech *et al.*, 2011). Por lo tanto, el elevado número de este tipo de alteraciones nucleares, sugiere que serían anomalías previas a la generación de nuevos MN.

VI CONSIDERACIONES FINALES

Finalmente, las técnicas de ensayo cometa, MN y AMN empleadas en la detección de efectos mutagénicos y genotóxicos en este trabajo, mostraron buena correlación con los índices de calidad de agua respectivos a cada sitio. Por ello, su aplicación en conjunto es necesaria para una correcta caracterización y evaluación de la genotoxicidad, tal como lo destacaran otros autores (Siu *et al.*, 2004; Kim y Hyun, 2006). Algunos trabajos han señalado la mayor sensibilidad del ensayo cometa frente al test de MN (Mitchelmore y Chipman, 1998; Kassie *et al.*, 2000; Lee y Steinert, 2003). Sin embargo, hay que considerar que la naturaleza de ambas técnicas es diferente. Mientras que el ensayo cometa detecta lesiones primarias reparables en el ADN y por lo tanto potencialmente reversibles, el test de MN detecta lesiones persistentes que deben sobrevivir al menos un ciclo celular, es decir, efectos clastogénicos y aneugénicos que no pueden ser reparados.

El daño detectado mediante ensayo cometa resulta de la interacción de dos procesos principales: la generación directa del daño (roturas en las hebras de ADN) y los mecanismos de reparación (activación o inhibición). Los MN por su parte, una vez que se forman, persisten hasta el final de la vida celular, siendo por lo tanto diferente a las lesiones detectadas por ensayo cometa, ya que generalmente escapan a los mecanismos de reparación. Otra característica diferencial entre ellos es que los efectos aneugénicos, que no suelen ser detectados mediante el ensayo cometa, suelen provocar frecuencias elevadas de MN; así como los entrecruzamientos o “crosslinks” retrasan la migración en la cola de los cometas. Entonces el daño detectado mediante ensayo cometa ocurre antes que se produzca la formación de los MN, indicando un estado inicial de contaminación y consecuente daño (Klobučar *et al.*, 2003).

Si bien el destino de los MN en las células es incierto, se proponen una serie de posibilidades acerca de su comportamiento post-mitótico: puede ser retenido en el citoplasma celular como una entidad extranuclear, siempre que sea capaz de completar uno o más ciclos de replicación del ADN; puede ser reincorporado al núcleo principal de la célula; puede conducir a la eliminación de la célula micronucleada por apoptosis; o bien es expulsado de la célula cuando el material genético contenido no resulta funcional o capaz de replicación. El significado biológico de los MN depende principalmente del destino de los mismos, pudiendo afectar de diferente manera el grado de ploidía de las células hijas. Claramente, los MN pueden llevar a potenciales variaciones en la cantidad de ADN y por ende, de los cromosomas en las células que los portan, con las consecuencias conocidas de los genotipos desbalanceados en términos de la transformación celular y el riesgo de cáncer (Kirsch-Volders *et al.*, 2011).

La implementación de bioensayos en la evaluación de calidad de ambientes de agua dulce como también de efluentes de diverso origen, resulta una herramienta importante en estudios ecotoxicológicos. A pesar del conocido deterioro de los ambientes acuáticos en nuestro país y específicamente en la provincia de Misiones, es inexistente la implementación de programas de monitoreo que permitan identificar riesgos para la biota acuática e indirectamente, para la salud humana. La puesta en marcha de estudios (monitoreos) rutinarios resultaría de vital importancia considerando el nivel elevado de descargas de efluentes sin tratamiento previo o con tratamientos irregulares tanto en el campo industrial como urbano y agrícola en grandes ríos como el Paraná, que constituye la fuente principal de agua para consumo humano en la mayoría de las ciudades del litoral argentino y sobre sus costas se asientan numerosos balnearios. A partir de los datos obtenidos en el presente estudio, se pone en evidencia la potencialidad genotóxica de sus aguas asociada a mezclas complejas de contaminantes. A pesar de ser uno de los mayores ríos de Sudamérica y de su importante caudal, determinadas variables químicas exceden los niveles guía establecidos por la normativa vigente y la evaluación de la calidad del agua a través de un índice que integra diversos parámetros físico-químicos, como el propuesto en este trabajo, es novedosa para la zona en estudio. A su vez, los biomarcadores utilizados y los modelos biológicos seleccionados se recomiendan para el análisis de calidad del recurso, ya que manifiestan respuestas tempranas ante la exposición a contaminantes y evidencian la potencialidad genotóxica presente en las muestras de agua del Río Paraná.

Este trabajo constituye a su vez el primer abordaje en modelos pertenecientes a distintos niveles de organización biológica, tanto *in vivo* como *in vitro*, que permiten un abordaje integrador desde el punto de vista genotoxicológico del Río Paraná a lo largo del eje fluvial que atraviesa la provincia de Misiones. Paralelamente, la reversión de los daños en el ADN observada en los tres modelos biológicos luego de la exposición a muestras de agua que reciben efluentes de industrias celulósicas/papeleras, sugieren que la implementación de medidas regulatorias capaces de controlar la correcta liberación de los efluentes industriales, así como el uso de metodologías más modernas en el tratamiento de dichos efluentes podrían mejorar notablemente la calidad de vida de los organismos residentes en estos ecosistemas y las condiciones de los ambientes acuáticos impactados.

A decorative horizontal band at the top of the page features a green sunburst or radial pattern. The pattern consists of numerous thin lines radiating from a central point on the right side, creating a fan-like effect that transitions from a light green on the left to a darker green on the right.

CONCLUSIONES

- Los estudios realizados en el Río Paraná mediante los ensayos cometa, micronúcleos (MN) y alteraciones de la morfología nuclear (AMN), pusieron de manifiesto el potencial genotóxico de sus aguas en todos los sitios evaluados de la provincia de Misiones.
- En el presente trabajo se elaboró el primer Índice de calidad de agua (ICA) para la zona de estudio y se realizó la primera evaluación de los efectos genotóxicos del Río Paraná en la provincia de Misiones con modelos biológicos pertenecientes a distintos niveles de organización, que permitieran una lectura más completa desde el punto de vista ecotoxicológico.
- En las zonas afectadas por efluentes de industrias de celulosa y papel sin tratamiento (Puerto Piray) se detectaron niveles de daño elevado en el material genético durante todo el período de estudio, alcanzando valores altamente significativos en todos los modelos biológicos con ambos biomarcadores: Ensayo Cometa, Test de MN y AMN. Al mismo tiempo, en esta localidad se registraron valores de ICA notablemente menores, alcanzando la categoría de calidad media de sus aguas en el año 2011.
- En áreas próximas a industrias papelereas con tratamiento de efluentes líquidos (Puerto Mineral), el agua también generó alteraciones moderadamente altas en el ADN, siendo observado un comportamiento menos regular y variando de acuerdo a los biomarcadores y bioindicadores analizados.
- El agua de sitios receptores de efluentes y desechos urbanos (Iguazú y Posadas) generó menor daño genotóxico en los bioindicadores estudiados tanto *in vivo* como *in vitro* que los afectados por efluentes industriales.
- Se detectaron tanto lesiones primarias y reparables en el ADN como daños no reparables del material genético en los modelos biológicos expuestos *in vivo* e *in vitro* a muestras de agua de los diferentes sitios estudiados. Esto se puso de manifiesto por las elevadas respuestas manifestadas con ambos biomarcadores de genotoxicidad, tanto con ensayo cometa (capaz de detectar lesiones potencialmente reversibles) como con el test de MN y AMN (capaz de detectar lesiones persistentes no reparables), principalmente luego de los bioensayos agudos.

- Tiempos prolongados de exposición a las muestras de agua en los ensayos *in vivo* se asociaron a disminución en el daño genotóxico observado a través de ambos biomarcadores, sugiriendo pérdida de la acción tóxica de las sustancias presentes durante los ensayos estáticos, o bien posibles mecanismos adaptativos de los organismos expuestos.
- Los ensayos de recuperación de daños *in vivo* mostraron reversión de las alteraciones en el material genético causadas por muestras de agua contaminadas con efluentes papeleros, evidenciando una clara relación entre tiempo de recuperación y disminución del daño en ambas especies de bivalvos. En *S. brevipinna*, sin embargo, no se observó la misma eficiencia en la reparación del ADN dañado.
- En ambas especies de bivalvos, los granulocitos de la hemolinfa constituyeron la subpoblación celular más sensible ante la presencia de sustancias contaminantes en el agua, siendo los únicos donde se encontraron AMN y mostrando respuestas más acentuadas que los hialinocitos con ambos biomarcadores. En los hialinocitos, por otra parte, la presencia de células multinucleadas con frecuencias similares en todos los tratamientos, sugiere que estas células mantienen la capacidad proliferativa como línea celular independiente y no serían consecuencia del daño al material genético.
- Las muestras de agua empleadas en los bioensayos provocaron en todos los modelos biológicos analizados, tanto *in vivo* como *in vitro*, MN de tamaños muy diversos. Esto, junto al incremento de las AMN consideradas precursoras en la formación de MN (especialmente los núcleos lobulados y con gemaciones), indica la presencia de sustancias con efectos clastogénicos y aneugénicos.
- De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, entre las especies de bivalvos, *C. fluminea* presenta mejores características como bioindicador para estudios de biomonitoreo mediante técnicas citogenéticas, ya que empíricamente se observó que *L. fortunei* muestra una marcada resistencia ante ambientes hostiles y degradados, manifestando efectos menos apreciables al ser evaluados diferentes biomarcadores de genotoxicidad.

- Los peces nativos de la especie *S. brevipinna* consituyen excelentes modelos como bioindicadores de genotoxicidad, ya que debido a sus características fisiológicas y ecológicas, manifiestan gran sensibilidad ante la exposición a muestras ambientales con distinto grado de contaminación.
- Las células CHO-K1 respondieron a los tratamientos con ambas técnicas, evidenciando diferentes grados de daño en el material genético y en relación a los ensayos *in vivo*, mostraron valores altamente significativos de MN. Este modelo podría representar una buena alternativa para abordar estudios de contaminación en cuerpos de agua.
- Las técnicas utilizadas en el presente trabajo para la detección de efectos genotóxicos del agua del Río Paraná, tanto el ensayo cometa como el test de MN y AMN, evidenciaron daños en el ADN de los bioindicadores mostrando correlación con los ICA de cada sitio. Debido a que dichas técnicas son capaces de detectar lesiones de distinta naturaleza a nivel del material genético, se recomienda su implementación de manera conjunta a los fines de obtener resultados más completos y una mejor caracterización de la potencialidad genotóxica de muestras ambientales.
- El empleo de biomarcadores de genotoxicidad permitió detectar alteraciones a nivel del material genético a pesar de que los índices de calidad de agua reflejaron buena condición del recurso acuático para la mayoría de los sitios. Por ello, la incorporación de bioensayos de genotoxicidad junto a determinaciones fisicoquímicas y otras herramientas analíticas, pueden contribuir a un abordaje integral en la evaluación de cuerpos de agua a los fines de generar información de utilidad en planes relacionados con manejo de cuencas. Este trabajo evidencia que la implementación de medidas regulatorias que controlen la liberación de efluentes industriales y urbanos, podrían mejorar las condiciones de los ambientes acuáticos impactados.



BIBLIOGRAFÍA

Aardema, MJ., Snyder, RD., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, RJ., Gibson, DP., Soelter, S., Curry, PT., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. y Lorge, E. (2006). SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test III. Using CHO cells. *Mutation Research*, 607: 61–87.

Adams, WJ. y Rowland CD. (2003). Aquatic Toxicology Test Methods. In: Hoffman, DJ., Rattner BA., Burton GAJ. y Cairns JJ. (Eds.). *Handbook of Ecotoxicology*. Cap. 2, pp. 19–44. Boca Ratón: Lewis Publishers, Estados Unidos.

Agnez-Lima, LF., Medeiros, SRB., Marques, RCP., Pinheiro, MM. y Menck, CFM. (2003). Processos de reparo de DNA: garantindo a estabilidade do material genético. In: Ribeiro, LR., Salvadori, DMF. y Marques, EK. (Orgs.). *Mutagênese Ambiental*. Cap. 3, pp. 49–79. Canoas: ULBRA, Brasil.

Agostinho, AA. y Ferreira, HJJ. (1999). Peixes da Bacia do Alto Río Paraná. In: Lowe-McConnel, RH. *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. Cap. 16, pp. 374–400. São Paulo: Edusp, Brasil.

Agostinho, AA., Gomes, LC. y Pelicice, FM. (2007). Ecología e Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatorios do Brasil. Cap. 5, pp. 153–225.

Al-Sabti, K. y Hardig, J. (1990). Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of industrial waste products in the Baltic Sea, Sweden. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97 (1): 179–182.

Al-Sabti, K. y Metcalfe, CD. (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, 343: 121–135.

Albert, LA. (1997). Contaminación ambiental. Origen, clases, fuentes y efectos. In: Albert, LA. (Ed.). *Introducción a la Toxicología Ambiental*. Cap. 4, pp 37–51. Metepec: ECO, México.

Ali, FK., El-Shehawi, AM. y Seehy, MA. (2008). Micronucleus test in fish genome: a sensitive monitor for aquatic pollution. *African Journal of Biotechnology*, 7 (5): 606–612.

Antón, D. (2000). El uso humano del agua y su impacto sobre los sistemas naturales. In: Antón, DJ. y Diaz Delgado, C. (Eds.). *Sequía en un mundo de agua*. Cap.8, pp 161–184. Estado de México: CIRA-UAMEX, México.

APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Work Association), WPCF (Water Pollution Control Federation) (1989). Standard Methods for the Water and Wastewater (17th Ed.), Ed. Franson M., Washington, USA.

Aragão, MA. y Araújo, RPA. (2006). Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: Zagatto PA. y Bertoletti E. (Eds.). Ecotoxicología Acuática. Cap. 6, pp 117–152. São Carlos: RiMa, Brasil.

Araujo, R., Moreno, D. y Ramos, MA. (1993). The Asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Bivalvia: Corbiculidae) in Europe. American Malacological Bulletin 10 (1): 39–49.

Avelar, WEP., Martim, SL. y Vianna MP. (2004). A new occurrence of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1856) (Bivalvia, Mytilidae) in the State of São Paulo, Brazil. Brazilian Journal of Biology, 64 (4): 739–742.

Avisahi, N., Rabinowitz, C., Moiseeva, E. y Rinkevich, B. (2002). Genotoxicity of the Kishon River, Israel: the application of an in vitro cellular assay. Mutation Research, 518: 21–37.

Ayllón, F. y Garcia Vazquez, E. (2000). Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in european minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. Mutation Research, 467: 177–186.

Baigún, C., Oldani, N. y Van Damme, PA. (2011). Represas hidroeléctricas en América Latina y su impacto sobre la ictiofauna: lecciones aprendidas. In: Van Damme, PA., Carvajal, F. y Molina Carpio, J. (Eds.). Los peces de la Amazonia boliviana: hábitats, potencialidades y amenazas. Cap. 16, pp. 397–416. Cochabamba: INIA, Bolivia.

Baršienė, J., Andreikėnaitė, L. y Rybakovas, A. (2006). Cytogenetic damage in perch (*Perca fluviatilis* L.) and Duck mussel (*Anodonta anatina* L.) exposed to crude oil. Ekologija, 1: 25–31.

Baršienė, J., Andreikėnaitė, L., Garnaga, G. y Rybakovas, A. (2008). Genotoxic and cytotoxic effects in the bivalve mollusks *Macoma balthica* and *Mytilus edulis* from the Baltic Sea. Ekologija, 54 (1): 44–50.

Baršienė, J., Andreikėnaitė, L. y Bjornstad, A. (2010). Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in blue mussels *Mytilus edulis* after 1-, 2-, 4- y 8-day treatment with crude oil from the North Sea. *Ekologija*, 56 (3): 124–131.

Baršienė, J., Rybakovas, A., Lang, T., Andreikėnaitė, L. y Michailovas, A. (2013). Environmental genotoxicity and cytotoxicity levels in fish from the North Sea offshore region and Atlantic coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, 68: 106–116.

Basu, S. y Guha, B. (2012). Assessment of genotoxicity induced by the effluent of supreme paper mill (India) on the fish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Proceedings of the Zoological Society*, 65 (2): 86–90.

Bayoumi, AE., Pérez-Pertejo, Y., Zidan, HZ., Balaña-Fouce, R., Ordóñez, C. y Ordóñez, D. (2003). Cytotoxic effects of two antimolting insecticides in mammalian CHO-K1 cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55: 19–23.

Becker, PH. (2003). Bioindicators in Use: Biomonitoring with Birds. In: Market, BA., Breure, AM. y Zechmeister, HG. (Eds.). *Bioindicators & Biomonitors. Principles, Concepts and Applications*. Cap. 2, pp. 677–736. Netherlands: Elsevier Science Ltd., Reino Unido.

Belaich, M., Oliver, C., Pillof, M. y Porta, A. (2006). Evaluation of a biomarker of Cd (II) exposure on *Limnoperna fortunei*. *Environmental Pollution*, 144: 280–288.

Belfiore, NM. y Anderson, SL. (2001). Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research*, 489: 97–122.

Bellini, MF., Angeli, JPF., Matuo, R., Terezan, AP., Ribeiro, LR. y Mantovani, MS. (2006). Antogenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assay in CHO-k1 and HTC cells. *Toxicology in Vitro*, 20: 355–360.

Bellini, MF., Cabriotti, LN., Terezan, AP., Quinzani Jordão, B., Ribeiro, LR. y Mantovani, MS. (2008). Cytotoxicity and genotoxicity of *Agaricus blazei* methanolic extract fractions assessed using gene and chromosomal mutation assays. *Genetics and Molecular Biology*, 31 (1): 122–127.

Bertoletti, E. y Zagatto, PA. (2006). Aplicação dos Ensaio Ecotoxicológicos e Legislação Pertinente. In: Zagatto PA. Y Bertoletti E. (Eds.). *Ecotoxicología Acuática*. Cap. 15, pp. 347–382. São Carlos: RiMa, Brasil.

Beyer, J., Aarab, N., Tandberg, AH., Ingvarsdottir, A., Bamber, S., Børseth, JF., Camus, L. y Velvin, R. (2013). Environmental harm assessment of a wastewater discharge from Hammerfest LNG: A study with biomarkers in mussels (*Mytilus sp.*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Marine Pollution Bulletin*, 69: 28–37.

Bikham, JW., Sandhu, S., Hebert, PDN., Chikhi, L. y Athwal, R. (2000). Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research*, 463: 33–51.

Bilos, C., Colombo, JC. y Presa, MJR. (1998). Trace metals in suspended particles, sediments and Asiatic clams (*Corbicula fluminea*) of the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environmental Pollution*, 99: 1–11.

Bolognesi, C., Buschini, A., Branchi, E., Carboni, P., Furlini, M., Martino, A., Monteverde, M., Poli, P. y Rossi, C. (2004). Comet and micronucleus assay in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Science of the Total Environment*, 333: 127–136.

Bolognesi, C., Perrone, E., Roggeri, P., Pampanin, DM. y Sciutto, A. (2006). Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology*, 785: 593–598.

Bolognesi, C. y Hayashi, M. (2011). Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26 (1): 205–213.

Bonanse, R. I., Amé, M.V. y Wunderlin, D.A. (2013). Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquía River basin (Argentina). *Chemosphere* 90: 1860–1869.

Bonetto, AA. y Hurtado, S. (1998). Cuenca del Plata. In: Canevari, P., Blanco, DE., Bucher, EH., Castro, G. y Davidson, I. (Eds.): *Los Humedales de la Argentina. Clasificación, situación actual, conservación y legislación*. Cap. 6, pp 31–72. Buenos Aires: Wetl. Int. Publ., Argentina.

Brassesco, MS., Pastori, MC., Roncati, HA. y Fenocchio AS. (2004). Comparative cytogenetic studies of Curimatidae (Pisces, Characiformes) from the middle Paraná River (Argentina). *Genetics and Molecular Research*, 3 (2): 293–301.

Breckenridge, RP., Manguba, M., Anderson, PJ. y Bartish, TM. (2003). Using Biomonitoring Data for Stewardship of Natural Resources. In: Hoffman, DJ., Rattner BA., Burton GAJ. y Cairns JJ. (Eds.). *Handbook of Ecotoxicology*. Cap. 10, pp. 233–256. Boca Ratón: Lewis Publishers, Estados Unidos.

Brendler-Schwaab, S., Hartmann, A., Pfuhrer, S. y Speit, G. (2005). The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, 20 (4): 245–254.

Caffetti, JD., Mantovani, MS., Pastori, MC y Fenocchio AS. (2008). First genotoxicity study of Paraná River water from Argentina using cells from the clam *Corbicula fluminea* (Veneroidea, Corbiculidae) and Chinese hamster *Crisetulus griseus* (Rodentia, Cricetidae) K1 cells in the comet assay. *Genetics and Molecular Biology*, 31 (2): 561–565.

Cajaraville, MP. y Pal, SG. (1995). Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment. *Cell Structure and Function*, 20: 355–367.

Carballal, MJ., López, MC., Azavedo, C. y Villalba, A. (1997). Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Disease of Aquatic Organisms*, 29: 127–135.

Carballo, MA. (2006). Surgimiento de la Genética Toxicológica. In: Mudry, MD. y Carballo, MA. *Genética Toxicológica*. Cap. 1, pp. 15–34. Buenos Aires: De Los Cuatro Vientos, Argentina.

Carballo, MA. y López Nigro, MM. (2006). Ambiente y Salud: Tóxicos Ambientales. In: Mudry, MD. y Carballo, MA. *Genética Toxicológica*. Cap. 19, pp. 495–520. Buenos Aires: De Los Cuatro Vientos, Argentina.

Carrasco, K.R., Tillbury, L.K. y Myers, M.S. (1990). An assessment of the piscine micronuclei test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47: 2123–2136.

Casciotta, J., Almirón, A. y Bechara, J. (2006). Peces del Iberá. Hábitat y Diversidad. Cap. 3, pp. 109–156. La Plata: Grafikar, Argentina.

- Cataldo, D., Colombo, J.C., Boltovskoy, D., Bilos, C. y Landoni, P. (2001).** Environmental toxicity assessment in the Paraná River delta (Argentina): simultaneous evaluation of selected pollutants and mortality rates of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) early juveniles. *Environmental Pollution*, 112: 379–389.
- Cataldo, D., Boltovskoy, D., Hermosa, J.L. y Canzi, C. (2005).** Temperature-dependent rates of larval development in *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae). *Journal of Molluscan Studies*, 71 (1): 41–46.
- Cataldo, D., O'Farrell, I., Paolucci, E., Sylvester, F. y Boltovskoy, D. (2012).** Impacto of the invasive golden mussel (*Limnoperna fortunei*) on phytoplankton and nutrient cycling. *Aquatic Invasions*, 7 (1): 91–100.
- Çavaş, T. y Ergene-Gözükara, S. (2003).** Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research*, 538: 81–91.
- Çavaş, T. y Ergene-Gözükara, S. (2005).** Micronucleus test in fish cells: a bioassay for *in situ* monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46: 64–70.
- Chang, S.J., Tseng, S.M. y Chou, S.Y. (2005).** Morphological characterization via light and electron microscopy of the hemocytes of two cultured bivalves: a comparison study between the hard clam (*Meretrix lusoria*) and pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Zoological Studies*, 44 (1): 144–153.
- Cherry, D.S. y Soucek, D.J. (2007).** Case Study: Comparison of Asian clam (*Corbicula fluminea*) *In Situ* Testing to Several Nontarget Test Organism Responses to Biocidal Dosing at a Nuclear Power Plant. In: Farris, J.L. y Van Hassel, J.H. (Eds.). *Freshwater Bivalve Ecotoxicology*. Cap. 11, pp. 285–305. New York: SETAC, Estados Unidos.
- Chovanec, A., Hofer, R. y Schiemer, F. (2003).** Bioindicators in Use: Fish as Bioindicators. In: Market, B.A., Breure, A.M. y Zechmeister, H.G. (Eds.). *Bioindicators & Biomonitoring. Principles, Concepts and Applications*. Cap. 2, pp. 639–676. Netherlands: Elsevier Science Ltd., Reino Unido.
- Claxton, L.D., Houk, V.S. y Hughes, T.J. (1998).** Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research*, 410: 237–243.

Colombo, J.C., Cappelletti, N., Williamson, N., Migoya, M.C., Speranza, E., Sericano, J. y Muir, DCG. (2011). Risk ranking of multiple-POPs in detritivorous fish from the Río de la Plata. *Chemosphere*, 83: 882-889.

Collins, AR. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26: 249–261.

Collins, AR., Dobson, V.L., Dusinská, M., Kennedy, G. y Štětina, R. (1997). The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*, 375: 183–193.

Collins, AR., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C. y Štětina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23 (3): 143–151.

Cossins, AR. y Crawford, D.L. (2005). Fish as models for environmental genomics. *Nature Reviews*, 6: 324–333.

Costa, P.M. y Costa, M.H. (2007). Genotoxicity assessment in fish peripheral blood: a method for a more efficient analysis of micronuclei. *Journal of Fish Biology*, 71: 148–151.

Cotelle, S. y Féraud, J.F. (1999). Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34: 246–255.

Darrigran, G. (2004). Moluscos invasores, en especial *Corbicula fluminea* (Almeja asiática) y *Limnoperna fortunei* (Mejillón dorado), de la Región Litoral. *Insugeo, Miscelánea*, 12: 205–210.

Darrigran, G. y Coppola, A. (1994). Los bivalves invasores del Río de la Plata. Su potencial uso como bioindicadores ambientales. *Tankay*, 1: 150–152.

Darrigran, G. y Damborenea, C. (2006). Bio-invasiones. In: Darrigran, G. y Damborenea, C. (Eds.). *Bio-invasión del Mejillón Dorado en el Continente Americano*. Cap. 1, pp. 15–39. La Plata: Edulp, Buenos Aires.

Decordier, I. y Kirsch-Volders, M. (2006). The in vitro micronucleus test: from past to future. *Mutation Research*, 607 (1): 2–4.

Devi, N.L., Yadav, I.C., Shihua, Q.I., Singh, S. y Belagali, S.L. (2011). Physicochemical characteristics of paper industry effluents – a case study of South India paper mill (SIPM). *Environmental Monitoring Assessment*, 177: 23–33.

Di Rienzo, J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C.W. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Dixon, DR., Pruski AM., Dixon, LRJ. y Jha, AN. (2002). Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis*, 17 (6): 495–507.

Doherty, FG. (1990). The Asiatic clam, *Corbicula spp.*, as a biological monitor in freshwater environments. *Environmental Monitoring and Assessment*, 15: 143–181.

Dokulil, MT. (2003). Bioindicators in use: Algae as Ecological Bio-indicators. In: Market, BA., Breure, AM. y Zechmeister, HG. (Eds.). *Bioindicators & Biomonitoring. Principles, Concepts and Applications*. Cap. 2, pp. 285–328. Netherlands: Elsevier Science Ltd., Reino Unido.

Dolcetti, L. y Venier, P. (2002). Susceptibility to genetic damage and cell types in Mediterranean mussels. *Marine Environmental Research* (54): 487–491.

Domingues, DF. y Bertoletti, E. (2006). Seleção, Manutenção e Cultivo de Organismos Aquáticos. In: Zagatto PA. y Bertoletti E. (Eds.). *Ecotoxicología Acuática*. Cap. 7, pp 153–184. São Carlos: RiMa, Brasil.

Dopp, E., Barker, CM., Schiffmann, D. y Reinisch, CL. (1996). Detection of micronuclei in hemocytes of *Mya arenaria*: association with leucemia and induction with an alkylating agente. *Aquatic Toxicology*, 34: 31–45.

Downs, CA., Fauth, JE., Downs, VD. y Ostrander, GK. (2010). In vitro cell-toxicity screening as an alternative animal model for coral toxicology: effects of heat stress, sulphide, rotenone, cyanide and cuprous oxide on cell viability and mitochondrial function. *Ecotoxicology*, 19: 171–184.

EBY-SECYT-CONICET. (2012). Informe final Calidad de Agua. Convenio específico EBY-VINTEC. Entidad Binacional Yacyretá. Departamento Obras Complementarias. Programa Calidad de Agua. Santa Fé, Argentina.

ECVAM. (2006). Statement on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. European Commission. Institute for Health and Consumer Protection. European Centre for the Validation of Alternative Methods.

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

Fairbairn, DW., Olive, PL. y O’neill, KL. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339: 37–59.

Fedato, RP., Simonato, JD., Martinez, CBR. y Sofia SH. (2010). Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 700: 80–85.

Fenech, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, 455: 81–95.

Fenech, M., Chang, WP., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. y Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534: 65–75.

Fenech, M., Kirsch-Volders, M, Natarajan, AT., Surralles, J., Crott, JW., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, DA., Tucker, JD. y Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26 (1): 125–132.

Ferrari, L. (2006). Generalidades sobre Ecotoxicología. In: Mudry, MD. y Carballo, MA. *Genética Toxicológica*. Cap. 15, pp. 393–421. Buenos Aires: De Los Cuatro Vientos, Argentina.

Fidis, A. (2007). Pulp fiction. Chemical hazard reduction at pulp and paper mills. Pp. 1–32. U.S. Pirg. Education Found. Washington D.C.

Fränze, O. (2003). Bioindicators and Environmental Stress Assessment. In: Market, BA., Breure, AM. Y Zechmeister, HG. (Eds.). *Bioindicators & Biomonitors. Principles*,

Concepts and Applications. Cap. 1, pp. 41–84. Netherlands: Elsevier Science Ltd., Reino Unido.

Frenzilli, G., Nigro, M. y Lyons, BP. (2009). The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research*, 681: 80–92.

Furnus, GNA., Caffetti, JD., García, EM., Benitez, MF., Pastori, MC. y Fenocchio, AS. (2012). Baseline frequencies of micronuclei and nuclear abnormalities in native fishes from Paraná River (Argentina). *Brazilian Journal of Biology*. (En prensa).

Galloway, S., Lorge, E., Aardema MJ., Eastmond, D., Fellows, M., Heflich, R., Kirkland, D., Levy, DD., Lynch, AM., Marzin, D., Morita, T., Schuler, M. y Speit, G. (2011). Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus). *Mutation Research*, 723: 77–83.

Giacomini Lemos, N., Dias, AL., Silva-Souza, AT. y Mantovani, MS. (2005). Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19: 197–201.

Gielazyn, ML., Ringwood, AH., Piegorsch, WW. y Stancyk, SE. (2003). Detection of oxidative damage in isolated marine bivalve hemocytes using the comet assay and formamidopyrimidinediglycosylase (Fpg). *Mutation Research*, 542: 15–22.

Giora, J. y Fialho, CB. (2003). Biología alimentar de *Steindachnerinabrevipinna* (Characiformes, Curimatidae) do río Ibicuí-Mirim, Río Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Série Zoológica*, 93 (3): 277–281.

Gontijo, AMMC. y Tice, R. (2003). Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro, LR., Salvadori, DMF. y Marques, EK. *Mutagenese ambiental*. Cap. 10, pp. 247–264. Canoas: ULBRA. Brasil.

González, M. y Arenas, T. (2002). Characterization of the immune response of the north scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Bivalvia). *Ciencias Marinas*, 28 (3): 247–255.

González, NV., Nikoloff, N., Soloneski, S. y Larramendy, ML. (2011). A combination of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay and centromeric identification for evaluation of the genotoxicity of dicamba. *Toxicology Letters*, 207: 204–212.

Graczyk, TK., Fayer, R., Cranfield, MR. y Conn, DB. (1997). In vitro interactions of Asian freshwater clam (*Corbicula fluminea*) hemocytes and *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (7): 2910–2912.

Gross, TS., Arnold, BS., Sepúlveda, MS. y McDobald, K. (2003). Endocrine disrupting chemicals and endocrine active agents. In: Hoffman, DJ., Rattner BA., Burton GAJ. y Cairns JJ. (Eds.). *Handbook of Ecotoxicology*. Cap. 39, pp. 1033–1098. Boca Ratón: Lewis Publishers, Estados Unidos.

Hansen, PD. (2003). Bioindicators in Use: Biomarkers. In: Market, BA., Breure, AM. y Zechmeister, HG. (Eds.). *Bioindicators & Biomonitoring. Principles, Concepts and Applications*. Cap. 2, pp. 203–220. Netherlands: Elsevier Science Ltd., Reino Unido.

Hartmann, A. y Speit, G. (2009). Comet Assay – Protocols and Testing Strategies. In: Dhawan, A. y Anderson, D. (Eds.). *The Comet Assay in Toxicology. Issues in Toxicology No.5*. Cap. 15, pp. 373–450.

Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N., Saotome, K., Tanaka, N., Takai, A., Sasaki YF., Asano N., Sofuni, T. y Ojima Y. (1998). Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation Research*, 399: 125–133.

Heddle, JA., Fenech, M., Hayashi, M. y McGregor, JT. (2011). Reflections on the development of micronucleus assays. *Mutagenesis*, 26 (1): 3–10.

Ho, YC., Show, KY., Guo, XX., Norli, I., Abbas, FMA. y Morad, N. (2012). Industrial discharge and their effect to the environment. In: Show, KY. y Guo, X. (Eds.). *Industrial waste*. Cap. 1, pp. 1–32. Intech, Croacia.

Holl, K. y Cairns, JJ. (2003). Landscape in Ecotoxicology. In: Hoffman, DJ., Rattner BA., Burton GAJ. y Cairns JJ. (Eds.). *Handbook of Ecotoxicology*. Cap. 9, pp. 219–232. Boca Ratón: Lewis Publishers, Estados Unidos.

Hooftman, RN. y De Raat, WK. (1982). Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Research*, 104: 147–152.

Houk, VS. (1992). The genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research*, 277: 91–138.

Izquierdo, JI., Machado, G., Ayllon, F., d'Amico, VL., Bala, LO., Vallarino, E., Elias, R. y García-Vázquez, E. (2003). Assessing pollution in coastal ecosystem: a preliminary survey using the micronucleus test in the mussel *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55: 24–29.

Jamili, S., Salimi, L., Motalebi, A. y Beshman MR. (2009). Morphological and structure characteristics of the hemocytes of the *Anodonta cygnea*. *Research Journal of Environmental Sciences*, 3 (2): 218–224.

Jha, AN. (2004). Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutation Research*, 552: 1–17.

Jha, AN. (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*, 1–15.

Kassie, F., Parzefall, W. y Knasmüller, S. (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 463: 13–31.

Kattan, GH. (2001). Extinción de especies y fragmentación del hábitat en el Neotrópico. In: Primack R., Rozzi R., Feinsinger P., Dirzo R. y Massardo F. *Fundamentos de Conservación Biológica. Perspectivas latinoamericanas*. Cap. 6, pp. 205–211. México D.F.: FCE, México.

Kienzl, K., Riss, A., Vogel, W., Hackl, J. y Götz, B. (2003). Bioindicators and biomonitoring for policy, legislation and administration. In: Market, BA., Breure, AM. y Zechmeister, HG. (Eds.). *Bioindicators & Biomonitoring. Principles, Concepts and Applications*. Cap. 3, pp. 85–122. Netherlands: Elsevier Science Ltd., Reino Unido.

Kim, IY. y Hyun, CK. (2006). Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64: 288–297.

Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A. y Wakata, A. (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research*, 540: 153–163.

Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Loock, KV. y Decordier, I. (2011). The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, 85: 873–899.

Klobučar, GIV., Pavlica, M., Erben, R. y Papes, D. (2003). Application of the micronucleus and comet assay to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology*, 64: 15–23.

Klobučar, GIV., Štambuk, A., Pavlica, M., Perić, MS., Hackenberger, BK. y Hylland, K. (2010). Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology*, 19: 77–84.

Kushwaha, B., Pandey, S., Sharma, S., Srivastava, R., Kumar, R., Nagpure, NS., Dabas, A. y Srivastava, SK. (2012). *In situ* assessment of genotoxic and mutagenic potential of polluted river water in *Channa punctatus* and *Mystus vittatus*. *International Aquatic Research*, 4: 16.

Lee, RF. y Steinert, F. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544: 43–64.

Lemaire-Gony, S. y Boudou, A. (1997). Mantle and gill fine structure in the freshwater Asiatic clam, *Corbicula fluminea* (Müller). *Annales de Limnologie- International Journal of Limnology*, 33 (3): 163–178.

Lopez Barea, J. y Pueyo, C. (1998). Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutation Research*, 399: 3–15.

López, HL., Miquelarena AM. y Ponte Gómez, J. (2005). Biodiversidad y Distribución de la Ictiofauna Mesopotámica. *INSUGEO, Miscelánea*, 14: 311–354.

Lorenz, CM. (2003). Bioindicators for ecosystem management, with special reference to freshwater system. In: Market, BA., Breure, AM. y Zechmeister, HG. (Eds.). Bioindicators & Biomonitoring. Principles, Concepts and Applications. Cap. 4, pp. 123–152. Netherlands: Elsevier Science Ltd., Reino Unido.

Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, MJ., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon, G. y Marzin, D. (2006). SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research*, 607: 13–36.

Magariños, MC. (2006). Contaminación Ambiental. In: Mudry, MD. y Carballo, MA. Genética Toxicológica. Cap. 16, pp. 423–458. Buenos Aires: De Los Cuatro Vientos, Argentina.

Maggioni, T., Hued, A.C., Monferrán, M.V., Bonansea, R.I., Galanti, L.N. y Amé, M.V. (2012). Bioindicators and biomarkers of environmental pollution in the middle-lower basin of the Suquía River (Córdoba, Argentina). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 63 (3): 337–353.

Mallick, P. y Khuda-Bukhsh, AR. (2003). Nuclear anomalies and blood protein variation in fish of the Hooghly-Matlah river system, India, as an indicator of genotoxicity in water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70: 1071–1082.

Market, BA., Breure, AM. y Zechmeister, HG. (2003). Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. In: Market, BA., Breure, AM. y Zechmeister, HG. (Eds.). Bioindicators & Biomonitoring. Principles, Concepts and Applications. Cap. 1, pp. 3–39. Netherlands: Elsevier Science Ltd., Reino Unido.

Matsumoto, ST., Mantovani, MS., Mallaguti, MI. y Marin-Morales, MA. (2003). Investigation of the genotoxic potential of the waters of a river receiving tannery effluents by means of the *in vitro* comet assay. *Cytologia*, 68 (4): 395–401.

Matsumoto, ST., Mantovani MS., Malagutti MIA., Dias AL., Fonseca IC. y Marin-Morales MA. (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.

- Menoli, RCN., Mantovani, MS., Ribeiro, LR., Gunter, S. y Jordão, BQ. (2001).** Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murril extracts on V79 cells. *Mutation Research*, 496: 5–13.
- Merlo, C., Abril, A., Amé, M.V., Argüello, G. A., Carreras, H. A., Chiappero, M.S., Hued, A.C., Wannaz, E., Galanti, L.N., Monferrán, M.V., González, C.M. y Solís, V.M. (2011).** Integral assessment of pollution in the Suquía River (Córdoba, Argentina) as a contribution to lotic ecosystem restoration programs. *Science of the Total Environment*, 409: 5034–5045.
- Mersch, J., Beauvais, MN. y Nagel, P. (1996).** Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*), exposed to clastogens. *Mutation Research*, 371: 47–55.
- Mersch, J. y Beauvais, MN. (1997).** The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments. *Mutation Research*, 393: 141–149.
- Miller, RC. (1973).** The micronucleus test as an in vivo cytogenetic method. *Environmental Health Perspectives*, 167–170.
- Mitchelmore, CL. y Chipman, JK. (1998).** DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*, 399: 135–147.
- Monroy, CM., Cortés, AC., Sicard, DM. y Restrepo HG. (2005).** Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas *in vitro* a glifosato. *Biomédica*, 25: 335–345.
- Monteiro, V., Cavalcante, DGSM., Viléla, MBFA., Sofia, SH. y Martinez, CBR. (2011).** *In vivo* and *in vitro* exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology*, 104: 291–298.
- Mozeto, AA. y Zagatto, PA. (2006).** Introdução de Agentes Químicos no Ambiente. In: Zagatto PA. y Bertoletti E. (Eds.). *Ecotoxicología Acuática*. Cap. 2, pp 15–38. São Carlos: RiMa, Brasil.

Mudry, MD. y Carballo, MA. (2006). Principios de Genética Toxicológica. In: Mudry, MD. y Carballo, MA. Genética Toxicológica. Cap. 2, pp. 35–55. Buenos Aires: De Los Cuatro Vientos, Argentina.

Natarajan, AT. (2002). Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research*, 504: 3–16.

Newton, TJ. y Cope, WG. (2007). Biomarker Responses of Unionid Mussels to Environmental Contaminants. In: Farris, JL. y Van Hassel, JH. (Eds.). *Freshwater Bivalve Ecotoxicology*. Cap. 10, pp.257–280. New York: SETAC, Estados Unidos.

OECD (1998). Series on Testing and Assessment No.11, Detailed Review Paper on Aquatic Testing Methods for Pesticides and Industrial Chemicals. OECD Environmental Health and Safety Publications.

OECD (2010). Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. OECD Publishing.

Oehlmann, J. y Schulte-Oehlmann, U. (2003). Bioindicators in Use: Molluscs as Bioindicators. In: Market, BA., Breure, AM. y Zechmeister, HG. (Eds.). *Bioindicators & Biomonitoring. Principles, Concepts and Applications*. Cap. 2, pp. 577–636. Netherlands: Elsevier Science Ltd., Reino Unido.

Ohe, T., Watanabe, T. y Wakabayashi, K. (2004). Mutagens in surface waters. *Mutation Research*, 567: 109–149.

Omar, WA., Zaghloul, KH., Abdel-Khalek, AA. y Abo-Hegab, S. (2012). Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. *Mutation Research*, 746: 7–14.

Oost, R., Beyer, J. y Vermeulen NPE. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57–149.

Osório, FHT., Silva, LFO., Piacini, LDS., Azevedo, ACB., Liebel, S., Yamamoto, FY., Phillipi, VP., Oliveira, MLS., Machado, CFO., Neto, FF., Cestari, MM., Silva de Assis, EC. y Ribeiro, CAO. (2013). Water quality assessment of Tubarão river through

chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. Environmental Science and Pollution Research. DOI 10.1007/s11356-013-1512-5.

Östling, O. y Johanson, KJ. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 123 (1): 291–298.

Pampanin, DM., Marin, MG y Ballarin, L. (2002). Morphological and cytoenzymatic characterization of haemocytes of the venus clam *Chamelea gallina*. Diseases of Aquatic Organisms, 49: 227–234.

Paolucci, EM., Thuesen EV., Cataldo, DH. y Boltovskoy, D. (2010). Veligers of an introduced bivalve, *Limnoperna fortunei*, are a new food resource that enhances growth of larval fish in the Paraná River (South America). Freshwater Biology, 55: 1831–1844.

Park, GM., Yong, TS., Im, KI. y Chung, EY. (2000). Karyotypes of three species of *Corbicula* (Bivalvia: Veneroidea) in Korea. Journal of Shellfish Research, 19 (2): 979–982.

Peña, CE., Carter, DE. y Ayala-Fierro, S. (2001). Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. Cap. 2, pp. 48–101. Arizona: Southwest Hazardous Waste Program, Estados Unidos.

Pereira Machado, M., Rodrigues Filho, E., Terezan, AP., Ribeiro, LR. y Mantovani, MS. (2005). Cytotoxicity, genotoxicity and antimutagenicity of hexane extracts of *Agaricus blazei* determined in vitro by the comet assay and CHO/HGPRT gene mutation assay. Toxicology in vitro, 19: 533–539.

Picco, SJ., De Luca, JC. y Dulout, FN. (2010). Genética Toxicológica y Animales Domésticos. In: Giovambattista, G. y Peral García, P. Genética de Animales Domésticos. Cap. 14, pp. 243–251. Buenos Aires: Inter-Médica, Argentina.

Pinheiro Silveira, M. (2004). Aplicação do biomonitoramento para avaliação da qualidade da água em ríos. Cap. 1, pp. 7–23. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, Brasil.

Piñeyro-López, A. (1997). Desarrollo de la Toxicología Contemporánea. In: Albert, LA. (Ed.). Introducción a la Toxicología Ambiental. Cap. 1, pp. 3–9. Metepec: ECO, México.

Power, EA. y Boumphrey, RS. (2004). International trends in bioassay use for effluent management. *Ecotoxicology*, 13: 337–398.

Prieto González, E. y Papeschi, A. (2006). Mecanismo de Reparación del ADN. In: Mudry, MD. y Carballo, MA. *Genética Toxicológica*. Cap. 6, pp. 133–174. Buenos Aires: De Los Cuatro Vientos, Argentina.

Primack, R., Rozzi, R., Feisinger, P. y Massardo, F. (2006). Conservación y desarrollo sustentable a nivel internacional. In: Primack R., Rozzi R., Feisinger P., Dirzo R. y Massardo F. *Fundamentos de Conservación Biológica. Perspectivas latinoamericanas*. Cap. 21, pp. 619–659. México D.F.: FCE, México.

Radić, S., Stipaničev, D., Cvjetko, P., Mikelić, IL., Rajčić, MM., Širac, S., Pevalek-Kozlina, B. y Pavlica, M. (2010). Ecotoxicological assessment of industrial effluent using duckweed (*Lemna minor* L.) as a test organism. *Ecotoxicology*, 19: 216–222.

Rajaguru, P., Vidya, L., Baskarathupathi, B., Kumar, PA., Palanival, M. y Kalaiselvi, K. (2002). Genotoxicity evaluation of pollution ground water in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay. *Mutation Research*, 517: 29–37.

Ratte, HT., Hammers-Wirtz, M. y Clauvers, M. (2003). Bioindicators in Use: Ecotoxicity Testing. In: Market, BA., Breure, AM. & Zechmeister, HG. (Eds.). *Bioindicators & Biomonitoring. Principles, Concepts and Applications*. Cap. 2, pp. 221–256. Netherlands: Elsevier Science Ltd., Reino Unido.

Reifferscheid, G., Ziemann, C., Fieblinger, D., Dill, F., Gminski, R., Grummt, HJ., Hafner, C., Hollert, H., Kunz, S., Rodrigo, G., Stopper, H. y Selke, D. (2008). Measurement of genotoxicity in wastewater samples with the *in vitro* micronucleus test—Results of a round-robin study in the context standardisation according to ISO. *Mutation Research*, 649: 15–27.

Ribeiro, LR. y Marques, EK. (2003). A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: Ribeiro, LR., Salvadori, DMF. y Marques, EK. (Orgs.). *Mutagênese Ambiental*. Cap. 1, pp. 21–27. Canoas: ULBRA, Brasil.

Rigonato, J., Mantovani MS. y Quinzani Jordão, B. (2005). Comet assay comparison of diferente *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. *Genetics and Molecular Biology*, 28 (3): 464–468.

Rigonato, J., Mantovani MS. y Quinzani Jordão, B. (2010). Detection of genotoxicity of water from an urbanized stream, in *Corbicula fluminea* (Mollusca) (In Vivo) and CHO-K1 cells (In Vitro) using comet assay. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 59: 31–38.

Rodriguez, E. (2006). Biomarcadores em Fauna Acuática: Estudios de Campo y de Laboratorio, en un Contexto Ecotoxicológico. In: Mudry, MD. y Carballo, MA. *Genética Toxicológica*. Cap. 17, pp. 459–480. Buenos Aires: De Los Cuatro Vientos, Argentina.

Rojas, E., López, MC. y Valverde, M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography*, 722: 225–254.

Rumi, A., Gutiérrez Gregoric, DE., Núñez, V. y Darrigran, GA. (2008). Malacología Latinoamericana. Moluscos de agua dulce de Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 56 (1): 77–111.

Ruiz, MCG. y Fortoul van der Goes, T. (1997). Conceptos Básicos de Toxicología Ambiental. In: Albert, LA. (Ed.). *Introducción a la Toxicología Ambiental*. Cap. 5, pp. 54–79. Metepec: ECO, México.

Schmid, W. (1976). The micronucleus Test for Cytogenetic Analysis. In: Hollaender, A. (Ed.). *Chemical Mutagens*. Vol. 4, pp. 31–53. New York: Plenum Press, Estados Unidos.

Seriani, R., Paiva, MJTR., Souza, ATS. y Napoleão, SR. (2011). Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas Gerais state, Brazil. *Acta Scientiarum, Biological Science*, 33 (1): 107–112.

Shugart, LR. y Theodorakis, C. (1998). New trends in biological monitoring: applications of biomarkers to genetic ecotoxicology. *Biotherapy*, 11: 119–127.

Shugart, LR., Theodorakis, CW., Bickham AM. y Bickham JW. (2003). Genetic Effects of Contaminant Exposure and Potential Impacts on Animal Populations. In:

Hoffman, DJ., Rattner BA., Burton GAJ. y Cairns JJ. (Eds.). Handbook of Ecotoxicology. Cap. 41, pp. 1129–1148. Boca Ratón: Lewis Publishers, Estados Unidos.

Simoniello, MF., Gigena, F., Polleta, G., Loteste, A., Kleinsorge, E., Campana, M., Scagnetti, J. y Parma MJ. (2009). Alkaline Comet Assay for Genotoxic Effect Detection in Neotropical Fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 83: 155–158.

Singh, NP., McCoy, MT., Tice, RR. y Schneider EL. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research, 175: 184–191.

Siu, WHL., Cao, J., Jack, RW., Wu, RSS., Richardson BJ., Xu. L. y Lam, PKS. (2004). Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). Aquatic Toxicology, 66: 381–392.

Souza, TS. y Fontanetti, CS. (2006). Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. Mutation Research, 605: 87–93.

Sousa, R., Freire, R., Rufino, M., Méndez, J., Gaspar, M., Antunes, C. y Guilhermino, L. (2007). Genetic and cell morphological variability of the invasive bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in two Portuguese estuaries. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 74: 166–174.

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.

Speit, G. y Rothfuss, A. (2012). The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage repair. Methods in Molecular Biology. DNA Repair Protocols, 920: 79–90.

Šrut, M., Štambuk, A., Pavlica, M. y Klobučar, GIV. (2010). Cage exposure of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) for *in situ* assessment of pollution-related genotoxicity. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 61: 29–36.

Straalen, NM., Janssens, TKS. y Roelofs, D. (2011). Micro-evolution of toxicant tolerance: from single genes to the genome's tangled bank. *Ecotoxicology*. DOI 10.1007/s10646-011-0631-3.

Tice, RR., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, JC. y Sasaki, YF. (2000). Single cell gel/ Comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221.

Tran, D., Fournier, E., Durrieu, G. y Massabuau, JC. (2004). Copper detection in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: optimum valve closure response. *Aquatic toxicology*, 66: 333–343.

Tran, D., Massabuau, JC. y Garnier-Laplace, J. (2008). Impact of hypoxia on hemolymph contamination by uranium in an aquatic animal, the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Environmental Pollution*, 156: 821–826.

Ulupinar, M. y Okumuş, I. (2002). Detection of mutagenic-carcinogenic pollutants in aquatic systems using cytogenetic methods in fish. *Turkish Journal of Zoology*, 26: 141–148.

Utani, KI., Kohno, Y., Okamoto, A. y Shimizu, N. (2010). Emergence of micronuclei and their effects on the fate of cells under replication stress. *PLoS ONE*, 5 (4): 1–12.

Van Der Oost, R., Beyer, J. y Vermeulen, NPE. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57–149.

Van Hassel, JH. y Farris JL. (2007). A Review of the Use of Unionid Mussels as Biological Indicators of Ecosystem Health. In: Farris, JL. y Van Hassel, JH. (Eds.). *Freshwater Bivalve Ecotoxicology*. Cap. 2, pp. 19–37. New York: SETAC, Estados Unidos.

Vargas, VMF., Motta, VEP. y Henriques, JAP. (1988). Analysis of mutagenicity of waters under the influence of petrochemical industrial complexes by the Ames Test (*Salmonella/Microsome*). *Brazilian Journal of Genetics*, 11 (3): 505–518.

Vargas, VMF., Guidobono, RR., Jordão, C. y Henriques, JAP. (1995). Use of two short-term test to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration/extraction procedures. *Mutation Research*, 343: 31–52.

Venier, P., Maron, S. y Canova, S. (1997). Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[*a*]pyrene. *Mutation Research*, 390: 33–44.

Venier, P. y Zampieron, C. (2005). Evidence of genetic damage in grass gobies and mussels from the Venice lagoon. *Environment International*, 31: 1053–1064.

Vidal, ML., Bassères, A. y Narbonne, JF. (2002). Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of *Corbicula fluminea* (Müller). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131: 133–151.

Villela, IV., Oliveira, IM., Silva, J. y Henriques, JAP. (2006). DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutation Research*, 605: 78–86.

Villela, IV., Oliveira, IM., Silveira, JC., Dias, JF., Henriques, JAP. y Silva, J. (2007). Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutation Research*, 628: 76–86.

Walker, JD. y Schultz, T.W. (2003). Structure activity relationship for predicting ecological effects of chemicals. In: Hoffman, DJ., Rattner BA., Burton GAJ. y Cairns JJ. (Eds.). *Handbook of Ecotoxicology*. Cap. 33, pp. 893–910. Boca Ratón: Lewis Publishers, Estados Unidos.

Waters, M.D., Brady, A.L., Stack, H.F. y Brockman, H.E. (1990). Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Research*, 238: 57–85.

White, PA. y Rasmussen, JB. (1998). The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research*, 410: 223–236.

Wirgin, I. y Waldman, JR. (1998). Altered gene expression and genetic damage in North American fish populations. *Mutation Research*, 399: 193–219.

Xu, X., Nagarajan, H., Lewis, NE., Pan, S., Cai, Z., Liu, X., Chen, W., Xie, M., Wang, W., Hammond, S., Andersen, MR., Neff, N., Passarelli, B., Koh, W., Fan, HC., Wang,

J., Gui, Y., Lee, KH., Betenbaugh, MJ., Quake, SR., Famili, I., Palsson, BO. y Wang, J. (2012). The genomic sequence of the Chinese Hamster Ovary (CHO) K1 cell line. *Nature Biotechnology*, 29 (8): 735–741.

Zagatto, PA. (2006). Ecotoxicología. In: Zagatto PA. y Bertolotti E. (Eds.). *Ecotoxicología Acuática*. Cap. 1, pp 1–13. São Carlos: RiMa, Brasil.

Zeeland, AA., Mullenders, LHF. y Vrieling, H. (2001). Gene and sequence specificity of DNA damage induction and repair: consequences for mutagenesis. *Mutation Research*, 485: 15–21.

Zhu, L., Huang, Y. y Liu, G. (2005). Using DNA damage to monitor water environment. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 23 (3): 340–348.

Zucco, F., De Angelis, I., Testai, E. y Stamatii, A. (2004). Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. *Toxicology in Vitro*, 18: 153–163.

ANEXOS

The image features a decorative horizontal band at the top. The background of this band is a light green color with a radial pattern of thin, white lines that converge towards a central point on the right side, creating a sunburst or fan effect. The word "ANEXOS" is printed in a bold, black, sans-serif font on the left side of this band.

ANEXO I

SECRETARIA DE RECURSOS HIDRICOS CUENCA DEL PLATA
SELECCIÓN DE LOS NIVELES GUIA DE CALIDAD DE AGUA EN FUNCION DE
LOS DIFERENTES USOS DEL RECURSO (1987)

USO I: Agua para consumo humano con tratamiento convencional; USO II: Agua para actividades recreativas con contacto directo; USO III: Agua para actividades agropecuarias; USO IV: Protección vida acuática

PARAMETROS	UNIDAD	I	II	III	IV
Temperatura	°C	*	*	*	*
Turbidez	UNT	*	*	*	*
pH	UpH	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5
Conductividad	µs/cm	*	*	*	*
Oxígeno disuelto	mgO ₂ /l	≥5	≥5	≥4	≥5
DBO – 20°C	mgO ₂ / l	≤3	≤3	≤3	≤3
Cloruros	mg / l	250	*	250	*
Nitrógeno amoniacal	mg N/ l	≤0,5	*	*	0,02 (+)
Nitrógeno de nitratos	mg N/ l	≤10	*	*	*
Nitrógeno de nitritos	mg N/ l	≤0,1	*	*	≤0,06
Coliformes totales	NPM/100 ml	≤5000 (-)	≤1000	*	*
Coliformes fecales	NPM/100 ml	≤1000 (-)	≤200	*	*
Compuestos fenólicos	mg fenol/l	≤0,001	*	*	≤0,001
Cianuros	mg / l	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,005
Arsénico	mg / l	≤0,05	≤0,05	≤0,05	≤0,05
Cadmio	mg / l	≤0,005	≤0,005	≤0,005	≤0,0002
Cobre	mg / l	≤0,1	*	≤0,2	≤0,002
Plomo	mg / l	≤0,05	*	≤0,05	≤0,001
Zinc	mg / l	≤5	≤5	≤5	≤0,03
Hierro total	mg / l	*	*	≤5	≤0,03
Cromo total	mg / l	≤0,05	≤0,05	≤0,05	≤0,002
Mercurio	µg / l	≤0,2	≤0,2	*	≤0,1
DQO	mg / l	*	*	*	*
Fósforo total	mg / l	*	*	*	*
Detergentes aniónicos	mg / l	≤0,5	*	*	*
Hidrocarburos totales	mg / l	≤0,2	*	*	*
Comp.org.tóx.orig.ind.		8	*	*	6
Plaguicidas		8	*	*	6
Sulfatos	mg / l	≤200	*	*	*
Dureza	mgCO ₃ Ca/l	≤100	*	*	*
Calcio	mg / l	*	*	*	*
Sodio	mg / l	*	*	*	*
Potasio	mg / l	*	*	*	*
Flúor	mg / l	≤1,5	≤1,5	≤1,5	*

PARAMETROS	UNIDAD	I	II	III	IV
Boro	mg / l	≤1	*	*	≤0,75
Manganeso	mg / l	≤0,05	*	≤0,2	≤0,1
Aluminio	mg / l	≤0,2	*	≤5	≤0,1
Selenio	mg / l	≤0,01	≤0,01	≤0,02	≤0,001
Bario	mg / l	*	*	*	*
Plata	mg / l	≤0,05	*	*	≤0,0001
Níquel	mg / l	≤0,025	*	≤0,2	≤0,025
Estaño	mg / l	*	*	*	*

(+) Como NH₃ no ionizado; (-) el 80% de los datos colectados deben cumplir;

(*) sin valores guía recomendados

ANEXO II

LIMITES MAXIMOS ADMISIBLES PARA DESCARGA DE EFLUENTES INDUSTRIALES A CURSOS RECEPTORES (LEY N° 2267) DE LA PROVINCIA DE MISIONES.

PARAMETROS	UNIDAD	LIMITES MAXIMOS
Temperatura	°C	45
pH	U	6 – 9
Amoníaco (NH ₃)	mg / l	5
Arsénico	mg / l	0,1
Sulfanato (Abs)	mg / l	0,5
Bario	mg / l	1
Boro	mg / l	1
Cadmio	mg / l	0,1
Cianuro	mg / l	0,2
Cobre	mg / l	1
Compuestos Fenólicos	mg / l	0,2
Cromo	mg / l	0,1
Ex. Carbon Cloroformo (ECC)	mg / l	0,3
Hierro soluble	mg / l	3
Manganeso	mg / l	0,5
Mercurio	mg / l	0,002
Níquel	mg / l	1
Nitrato	mg / l	45
Plata	mg / l	0,001
Plomo	mg / l	0,05
Selenio	mg / l	0,01
Sulfuros	mg / l	1
Zinc	mg / l	5
Coliformes totales	NPM / 100 ml	20.000
Coliformes fecales	NPM / 100 ml	2.000
Demanda de cloro		Satisfecha (*)

(*) Demanda de cloro: La condición establecida se exigirá para aquellas industrias cuyos efluentes provoquen contaminación biológica (curtiembres, mataderos, frigoríficos).

ANEXO III
ENSAYO COMETA

Tabla I: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en células de hemolinfa de *C. fluminea* luego de 3 días de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2009

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases cometas					Total células analizadas (100 células/individuo)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	6,29 \pm 2,14	93,86	6,00	0,14	0,00	0,00	700
Iguazú	7,75 \pm 1,50	92,50	7,25	0,25	0,00	0,00	400
Pto.Piray	16,80 \pm 5,93	85,60	12,40	1,60	0,40	0,00	500
Pto. Mineral	13,40 \pm 5,22	89,40	8,60	1,20	0,80	0,00	500
Posadas	17,50 \pm 5,80	85,25	12,50	2,00	0,00	0,25	400
C. Positivo	32,50 \pm 11,13	74,17	20,33	4,33	1,17	0,00	600

Tabla II: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en células de hemolinfa de *C. fluminea* luego de 10 días de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2009

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/individuo)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	10,44 \pm 6,27	90,89	8,22	0,56	0,22	0,11	900
Iguazú	10,00 \pm 2,83	91,50	7,50	0,50	0,50	0,00	300
Pto.Piray	18,20 \pm 17,02	86,60	10,40	1,60	1,00	0,40	500
Pto. Mineral	10,20 \pm 5,59	91,20	8,20	0,20	0,00	0,40	500
Posadas	10,25 \pm 4,57	91,00	7,75	1,25	0,00	0,00	400
C. Positivo	32,50 \pm 11,13	74,17	20,33	4,33	1,17	0,00	600

Tabla III: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en células de hemolinfa de *C. fluminea* luego de 3 días de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2010

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/individuo)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	6,29 \pm 2,14	93,86	6,00	0,14	0,00	0,00	700
Iguazú	6,75 \pm 4,57	93,75	5,75	0,50	0,00	0,00	400
Pto. Piray	37,80 \pm 7,89	67,20	29,00	3,20	0,00	0,60	500
Pto. Mineral	30,80 \pm 9,04	73,00	23,60	3,00	0,40	0,00	500
Posadas	22,80 \pm 5,36	80,40	16,60	2,80	0,20	0,00	500
C. Positivo	32,50 \pm 11,13	74,17	20,33	4,33	1,17	0,00	600

Tabla IV: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en células de hemolinfa de *C. fluminea* luego de 10 días de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2010

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/individuo)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	10,44 \pm 6,27	90,89	8,22	0,56	0,22	0,11	900
Iguazú	9,33 \pm 4,16	92,33	6,33	1,00	0,33	0,00	300
Pto. Piray	12,60 \pm 6,77	88,60	10,60	0,40	0,40	0,00	500
Pto. Mineral	8,00 \pm 2,94	92,25	7,50	0,25	0,00	0,00	400
Posadas	18,00 \pm 7,81	84,00	14,00	2,00	0,00	0,00	300*
C. Positivo	32,50 \pm 11,13	74,17	20,33	4,33	1,17	0,00	600

* Mortalidad del 27% de los individuos: 3 de 11 ejemplares expuestos murieron al noveno día.

Tabla V: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en células de hemolinfa de *C. fluminea* luego de 3 días de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2011

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/individuo)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	6,29 \pm 2,14	93,86	6,00	0,14	0,00	0,00	700
Iguazú	13,00 \pm 1,73	88,67	10,33	0,67	0,00	0,33	300
Pto.Piray	33,00 \pm 19,79	76,40	17,80	3,00	2,00	0,80	500*
Pto. Mineral	20,60 \pm 4,51	81,80	16,20	1,60	0,40	0,00	500
Posadas	20,00 \pm 3,48	81,00	18,00	1,00	0,00	0,00	300
C. Positivo	32,50 \pm 11,13	74,17	20,33	4,33	1,17	0,00	600

*Mortalidad del 9% de los individuos: 1 de 11 ejemplares expuestos murió al segundo día.

Tabla VI: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en células de hemolinfa de *C. fluminea* luego de 10 días de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2011

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/individuo)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	10,44 \pm 6,27	90,89	8,22	0,56	0,22	0,11	900
Iguazú	18,25 \pm 9,39	86,25	11,50	0,50	1,25	0,50	400
Pto.Piray	24,00 \pm 11,25	78,20	20,00	1,60	0,00	0,20	500
Pto. Mineral	16,60 \pm 1,14	85,40	12,80	1,60	0,20	0,00	500
Posadas	10,67 \pm 4,04	90,33	8,67	1,00	0,00	0,00	300
C. Positivo	32,50 \pm 11,13	74,17	20,33	4,33	1,17	0,00	600

Tabla VII: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en células de hemolinfa de *L. fortunei* luego de 3 días de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2009

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/individuo)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	7,6 \pm 2,07	93,20	6,00	0,80	0,00	0,00	500
Iguazú	10 \pm 5,66	93,00	5,00	1,50	0,00	0,50	300
Pto. Piray	17,5 \pm 4,89	85,67	11,83	1,83	0,67	0,00	500*
Pto. Mineral	12,25 \pm 8,18	90,75	7,00	1,50	0,75	0,00	400
Posadas	12,43 \pm 6,40	88,43	10,71	0,86	0,00	0,00	700
C. Positivo	35,83 \pm 25,40	74,83	18,50	3,67	2,00	1,00	600

*Mortalidad del 9% de los individuos: 1 de 11 ejemplares expuestos murió al segundo día.

Tabla VIII: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en células de hemolinfa de *L. fortunei* luego de 10 días de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2009

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/individuo)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	7,8 \pm 2,49	92,20	7,80	0,00	0,00	0,00	500
Iguazú	8,33 \pm 2,31	91,67	8,33	0,00	0,00	0,00	300
Pto. Piray	20,33 \pm 2,31	83,33	13,67	2,33	0,67	0,00	300*
Pto. Mineral	23,33 \pm 3,93	82,17	14,17	2,33	0,83	0,50	600
Posadas	17,6 \pm 9,86	87,40	9,60	1,60	0,80	0,60	500
C. Positivo	35,83 \pm 25,40	74,83	18,50	3,67	2,00	1,00	600

*Mortalidad del 18% de los individuos: 2 de 11 ejemplares expuestos murieron al octavo día.

Tabla IX: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en células de hemolinfa de *L. fortunei* luego de 3 días de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2010

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/individuo)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	7,6 \pm 2,07	93,20	6,00	0,80	0,00	0,00	500
Iguazú	16 \pm 7,94	89,20	8,00	1,00	1,20	0,60	500
Pto. Piray	47,67 \pm 17,91	63,67	28,17	5,83	1,50	0,83	600
Pto. Mineral	24,29 \pm 17,79	80,29	16,29	2,43	0,86	0,14	500
Posadas	21,5 \pm 6,45	83,25	13,25	2,50	0,75	0,25	400
C. Positivo	35,83 \pm 25,40	74,83	18,50	3,67	2,00	1,00	600

Tabla X: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en células de hemolinfa de *L. fortunei* luego de 10 días de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2010

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/individuo)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	7,8 \pm 2,49	92,20	7,80	0,00	0,00	0,00	500
Iguazú	14,5 \pm 5,80	89,50	8,25	0,75	1,25	0,25	400
Pto. Piray	15,17 \pm 5,27	85,50	13,83	0,67	0,00	0,00	600
Pto. Mineral	9,67 \pm 9,29	90,67	9,00	0,33	0,00	0,00	500
Posadas	33,25 \pm 14,44	78,25	15,63	2,25	2,38	1,50	800
C. Positivo	35,83 \pm 25,40	74,83	18,50	3,67	2,00	1,00	600

Tabla XI: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en células de hemolinfa de *L. fortunei* luego de 3 días de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2011

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/individuo)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	7,6 \pm 2,07	93,20	6,00	0,80	0,00	0,00	500
Iguazú	13,25 \pm 3,30	87,75	11,25	1,00	0,00	0,00	400
Pto.Piray	43,4 \pm 32,73	71,40	20,40	3,60	2,60	2,00	600
Pto. Mineral	24,17 \pm 9,24	82,17	14,17	2,17	0,33	1,17	600
Posadas	25 \pm 7,94	83,00	11,67	3,33	1,33	0,67	300
C. Positivo	35,83 \pm 25,40	74,83	18,50	3,67	2,00	1,00	600

Tabla XII: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en células de hemolinfa de *L. fortunei* luego de 10 días de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2011

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/individuo)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	7,8 \pm 2,49	92,20	7,80	0,00	0,00	0,00	500
Iguazú	12,6 \pm 3,21	89,60	8,80	1,00	0,60	0,00	500
Pto.Piray	40,6 \pm 31,81	76,40	14,40	3,60	3,40	2,20	500
Pto. Mineral	20,17 \pm 14,51	85,33	10,67	2,67	1,17	0,17	600
Posadas	19,8 \pm 9,50	85,20	12,00	1,60	0,20	1,00	500
C. Positivo	35,83 \pm 25,40	74,83	18,50	3,67	2,00	1,00	600

Tabla XIII: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en eritrocitos de *S.brevipinna* luego de 3 días de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2009

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/individuo)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	3,6 \pm 2,30	96,60	3,20	0,20	0,00	0,00	500
Iguazú	15,33 \pm 4,73	85,67	13,33	1,00	0,00	0,00	300
Pto.Piray	19,6 \pm 5,94	84,80	11,40	3,20	0,60	0,00	500
Pto. Mineral	27,2 \pm 6,83	79,80	15,20	3,20	1,60	0,20	500
Posadas	19 \pm 5,74	85,00	12,40	1,60	0,60	0,40	500
C. Positivo	114 \pm 32,01	50,00	17,50	14,67	10,83	7,00	600

Tabla XIV: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en eritrocitos de *S.brevipinna* luego de 10 días de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2009

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/individuo)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	5,2 \pm 1,64	94,80	5,20	0,00	0,00	0,00	500
Iguazú	8,86 \pm 8,53	91,29	8,57	0,14	0,00	0,00	700
Pto.Piray	27,2 \pm 10,03	79,40	15,60	3,60	1,20	0,20	500
Pto. Mineral	24,67 \pm 2,52	82,33	13,00	3,00	1,00	0,67	600
Posadas	16,4 \pm 8,29	86,00	11,80	2,00	0,20	0,00	500
C. Positivo	114 \pm 32,01	50,00	17,50	14,67	10,83	7,00	600

Tabla XV: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en eritrocitos de *S.brevipinna* luego de 3 días de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2010

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/individuo)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	3,6 \pm 2,30	96,60	3,20	0,20	0,00	0,00	500
Iguazú	13 \pm 3,37	89,25	8,75	1,75	0,25	0,00	400
Pto.Piray	61,5 \pm 11,09	57,00	29,50	9,25	3,50	0,75	400
Pto. Mineral	43,75 \pm 23,10	68,00	23,50	6,00	1,75	0,75	400
Posadas	13,4 \pm 7,83	86,60	11,60	0,60	0,20	0,00	500
C. Positivo	114 \pm 32,01	50,00	17,50	14,67	10,83	7,00	600

Tabla XVI: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en eritrocitos de *S.brevipinna* luego de 10 días de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2010

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/individuo)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	5,2 \pm 1,64	94,80	5,20	0,00	0,00	0,00	500
Iguazú	18,25 \pm 9,29	85,25	12,75	1,25	0,00	0,75	400
Pto.Piray	-	-	-	-	-	-	- (*)
Pto. Mineral	11 \pm 5,66	89,50	10,00	0,50	0,00	0,00	200
Posadas	33,4 \pm 9,32	74,00	20,00	3,80	1,40	0,40	500
C. Positivo	114 \pm 32,01	50,00	17,50	14,67	10,83	7,00	600

(*) Mortalidad del 50% de los ejemplares expuestos entre el quinto y sexto día a muestras de agua pertenecientes a este sitio (de un total de 10 ejemplares expuestos al inicio del ensayo).

Tabla XVII: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en eritrocitos de *S.brevipinna* luego de 3 días de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2011

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/individuo)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	3,6 \pm 2,30	96,60	3,20	0,20	0,00	0,00	500
Iguazú	26,5 \pm 9,54	81,25	14,00	2,75	1,00	1,00	400
Pto.Piray	26 \pm 7,83	77,75	18,75	3,25	0,25	0,00	400
Pto. Mineral	31,75 \pm 4,92	75,25	19,00	4,75	0,75	0,25	400
Posadas	-	-	-	-	-	-	- (*)
C. Positivo	114 \pm 32,01	50,00	17,50	14,67	10,83	7,00	600

(*) Mortalidad del 100% de los ejemplares expuestos entre el segundo y quinto día a muestras de agua pertenecientes a este sitio (de un total de 8 ejemplares expuestos al inicio del ensayo).

Tabla XVIII: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en eritrocitos de *S.brevipinna* luego de 10 días de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2011

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/individuo)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	5,2 \pm 1,64	94,80	5,20	0,00	0,00	0,00	500
Iguazú	21 \pm 1	82,33	15,00	2,00	0,67	0,00	300
Pto.Piray	34,6 \pm 15,09	74,60	19,40	3,40	2,00	0,60	500
Pto. Mineral	9,4 \pm 5,81	91,60	7,40	1,00	0,00	0,00	500
Posadas	-	-	-	-	-	-	- (*)
C. Positivo	114 \pm 32,01	50,00	17,50	14,67	10,83	7,00	600

(*) Mortalidad del 100% de los ejemplares expuestos entre el segundo y quinto día a muestras de agua pertenecientes a este sitio (de un total de 8 ejemplares expuestos al inicio del ensayo).

Tabla XIX: Ensayo de recuperación de daños en el ADN de *C. fluminea* luego de bioensayos de tres días de exposición con aguas del río Paraná durante el año 2011, evaluados mediante ensayo cometa y expresados como Media del índice de daño \pm Desvío estándar (M \pm DE).

Sitios de muestreo	Tratamiento	Índice de daño (M \pm DE)			Total células analizadas 100 células/individuo
		Recuperación 3 días	Recuperación 5 días	Recuperación 10 días	
Pto.Piray	33 \pm 19,79	17,33 \pm 9,02	14 \pm 4,24	600	
Pto. Mineral	20,6 \pm 4,51	18 \pm 9,90	8 \pm 2,37	600	

Tabla XX: Ensayo de recuperación de daños en el ADN de hemocitos de *C. fluminea* luego de bioensayos de diez días de exposición con aguas del río Paraná durante el año 2011, evaluados mediante ensayo cometa y expresados como Media del índice de daño \pm Desvío estándar (M \pm DE)

Sitios de muestreo	Tratamiento	Índice de daño (M \pm DE)			Total células analizadas 100 células/individuo
		Recuperación 10 días	Recuperación 5 días	Recuperación 10 días	
Pto.Piray	24 \pm 11,25	17,25 \pm 8,54	13,5 \pm 0,71	600	
Pto. Mineral	16,6 \pm 1,14	20,5 \pm 9,19	16,67 \pm 5,51	600	

Tabla XXI: Ensayo de recuperación de daños en el ADN de hemocitos de *L. fortunei* luego de bioensayos de tres días de exposición con aguas del río Paraná durante el año 2011, evaluados mediante ensayo cometa y expresados como Media del índice de daño \pm Desvío estándar (M \pm DE)

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)			Total células analizadas 100 células/individuo
	Tratamiento 3 días	Recuperación 5 días	Recuperación 10 días	
Pto. Piray	43,4 \pm 32,73	14,33 \pm 13,58	13,5 \pm 3,54	600
Pto. Mineral	24,17 \pm 9,24	27,80 \pm 11,76	23 \pm 9,62	600

Tabla XXII: Ensayo de recuperación de daños en el ADN de hemocitos de *L. fortunei* luego de bioensayos de diez días de exposición con aguas del río Paraná durante el año 2011, evaluados mediante ensayo cometa y expresados como Media del índice de daño \pm Desvío estándar (M \pm DE)

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)			Total células analizadas 100 células/individuo
	Tratamiento 10 días	Recuperación 5 días	Recuperación 10 días	
Pto. Piray	40,6 \pm 31,81	51 \pm 37,13	9 \pm 1,41	600
Pto. Mineral	20,17 \pm 14,51	24,5 \pm 0,71	17 \pm 3,48	400

Tabla XXIII: Ensayo de recuperación de daños en el ADN de eritrocitos de *S. brevipinna* luego de bioensayos de tres días de exposición con aguas del río Paraná durante el año 2011, evaluados mediante ensayo cometa y expresados como Media del índice de daño \pm Desvío estándar (M \pm DE)

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)				Total células analizadas 100 células/individuo
	Tratamiento 3 días	Recuperación 5 días	Recuperación 10 días	Recuperación 15 días	
Pto. Piray	26 \pm 7,83	21 \pm 1,41	16 \pm 5,39		700
Pto. Mineral	31,75 \pm 4,92	30,67 \pm 5,86	13,5 \pm 2,12	9 \pm 1,41	700

Tabla XXIV: Ensayo de recuperación de daños en el ADN de eritrocitos de *S. brevipinna* luego de bioensayos de diez días de exposición con aguas del río Paraná durante el año 2011, evaluados mediante ensayo cometa y expresados como Media del índice de daño \pm Desvío estándar (M \pm DE)

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)				Total células analizadas 100 células/individuo
	Tratamiento 10 días	Recuperación 5 días	Recuperación 10 días	Recuperación 15 días	
Pto. Piray	34,6 \pm 15,09	26,67 \pm 3,79	12 \pm 0		600
Pto. Mineral	24,76 \pm 2,52	18,25 \pm 5,68	13,5 \pm 2,12	10,25 \pm 4,86	800

Tabla XXV: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en células CHO-K1 luego de 2 hs de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2009

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/tratamiento/repetición)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	5 \pm 3,61	95,33	4,33	0,33	0,00	0,00	300
Iguazú	14,33 \pm 4,93	87,00	11,67	1,33	0,00	0,00	300
Pto. Piray	26,33 \pm 18,77	82,33	12,00	3,33	1,67	0,67	300
Pto. Mineral	12 \pm 1,73	89,00	10,33	0,33	0,33	0,00	300
Posadas	13 \pm 10,44	89,00	9,67	0,67	0,67	0,00	300
C. Positivo	319,33 \pm 48,13	13,00	2,00	1,67	19,33	64,00	300

Tabla XXVI: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en células CHO-K1 luego de 2 hs de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2010

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/tratamiento/repetición)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	5 \pm 3,61	95,33	4,33	0,33	0,00	0,00	300
Iguazú	32,67 \pm 16,80	76,33	17,67	3,00	1,67	1,00	300
Pto. Piray	32,33 \pm 16,77	80,00	14,00	2,67	0,33	3,00	300
Pto. Mineral	27,67 \pm 4,93	78,67	16,67	3,33	1,00	0,33	300
Posadas	12 \pm 3,61	88,67	10,67	0,67	0,00	0,00	300
C. Positivo	319,33 \pm 48,13	13,00	2,00	1,67	19,33	64,00	300

Tabla XXVII: Distribución media de daños entre clases de cometas e índices de daño (media \pm desvío estándar) en células CHO-K1 luego de 2 hs de exposición a tratamientos con muestras de agua del río Paraná y controles durante el año 2011

Sitios de muestreo	Índice de daño (M \pm DE)	Clases de cometas					Total células analizadas (100 células/tratamiento/repetición)
		0	1	2	3	4	
C. Negativo	3,33 \pm 4,93	97,00	2,67	0,33	0,00	0,00	300
Iguazú	20,33 \pm 2,08	82,00	16,00	1,67	0,33	0,00	300
Pto.Piray	33 \pm 7,55	75,67	19,67	2,00	1,33	1,33	300
Pto. Mineral	39 \pm 22,61	74,67	18,67	2,67	1,00	3,00	300
Posadas	31,33 \pm 11,24	76,67	19,00	2,00	1,00	1,33	300
C. Positivo	219,33 \pm 59,20	25,00	12,33	12,33	19,00	31,33	300

ANEXO IV

MICRONÚCLEOS Y ALTERACIONES DE LA MORFOLOGÍA NUCLEAR

Tabla I: Frecuencias medias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en células de hemolinfa (granulocitos y hialinocitos) de *C. fluminea* expuestas durante 3 días a tratamientos con muestras de agua del Río Paraná y controles durante el año 2009

Tratamiento	Granulocitos		Total células analizadas	Hialinocitos		Total células analizadas
	MN	AMN		MN	AMN	
C. Negativo	0,00097	0,02926	4100	0,00046	0,00000	4300
Iguazú	0,00148	0,03666	2200	0,00051	0,00000	2700
Pto. Piray	0,00135	0,02761	2500	0,00000	0,00000	2600
Pto. Mineral	0,00210	0,01811	2300	0,00083	0,00000	2200
Posadas	0,00135	0,02906	2700	0,00042	0,00000	2000
C. Positivo	0,00446	0,04503	4200	0,00147	0,00000	2800

Tabla II: Frecuencias medias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en células de hemolinfa (granulocitos y hialinocitos) de *C. fluminea* expuestas durante 10 días a tratamientos con muestras de agua del Río Paraná y controles durante el año 2009

Tratamiento	Granulocitos		Total células analizadas	Hialinocitos		Total células analizadas
	MN	AMN		MN	AMN	
C. Negativo	0,00041	0,00538	3200	0,00066	0,00000	4500
Iguazú	0,00129	0,02064	1400	0,00000	0,00000	1500
Pto. Piray	0,00326	0,01426	2600	0,00076	0,00000	3600
Pto. Mineral	0,00170	0,00598	2800	0,00045	0,00000	3000
Posadas	0,00056	0,04079	2800	0,00080	0,00000	2500
C. Positivo	0,00446	0,04503	4200	0,00147	0,00000	2800

Tabla III: Frecuencias medias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en células de hemolinfa (granulocitos y hialinocitos) de *C. fluminea* expuestas durante 3 días a tratamientos con muestras de agua del Río Paraná y controles durante el año 2010

Tratamiento	Granulocitos		Total células analizadas	Hialinocitos		Total células analizadas
	MN	AMN		MN	AMN	
3 días						
C. Negativo	0,00097	0,02926	4100	0,00046	0,00000	4300
Iguazú	0,00050	0,00507	2700	0,00183	0,00000	1800
Pto. Piray	0,00680	0,07280	2300	0,00192	0,00000	1800
Pto. Mineral	0,00485	0,05293	2300	0,00223	0,00000	1800
Posadas	0,00296	0,02888	2900	0,00100	0,00000	2300
C. Positivo	0,00446	0,04503	4200	0,00147	0,00000	2800

Tabla IV: Frecuencias medias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en células de hemolinfa (granulocitos y hialinocitos) de *C. fluminea* expuestas durante 10 días a tratamientos con muestras de agua del Río Paraná y controles durante el año 2010

Tratamiento	Granulocitos		Total células analizadas	Hialinocitos		Total células analizadas
	MN	AMN		MN	AMN	
10 días						
C. Negativo	0,00041	0,00538	3200	0,00066	0,00000	4500
Iguazú	0,00000	0,00426	1500	0,00131	0,00000	1600
Pto. Piray	0,00302	0,02418	2400	0,00437	0,00000	1900
Pto. Mineral	0,00285	0,04214	1600	0,00333	0,00000	2100
Posadas	0,00464	0,04918	1700	0,00120	0,00000	1200
C. Positivo	0,00446	0,04503	4200	0,00147	0,00000	2800

Tabla V: Frecuencias medias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en células de hemolinfa (granulocitos y hialinocitos) de *C. fluminea* expuestas durante 3 días a tratamientos con muestras de agua del Río Paraná y controles durante el año 2011

Tratamiento	Granulocitos		Total células analizadas	Hialinocitos		Total células analizadas
	MN	AMN		MN	AMN	
3 días						
C. Negativo	0,00097	0,02926	4100	0,00046	0,00000	4300
Iguazú	0,00360	0,04329	2500	0,00054	0,00000	1900
Pto. Piray	0,00964	0,05071	2800	0,00161	0,00000	2300
Pto. Mineral	0,00308	0,04000	3900	0,00220	0,00000	2400
Posadas	0,00632	0,03684	1000	0,00545	0,00000	1100
C. Positivo	0,00446	0,04503	4200	0,00147	0,00000	2800

Tabla VI: Frecuencias medias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en células de hemolinfa (granulocitos y hialinocitos) de *C. fluminea* expuestas durante 10 días a tratamientos con muestras de agua del Río Paraná y controles durante el año 2011

Tratamiento	Granulocitos		Total células analizadas	Hialinocitos		Total células analizadas
	MN	AMN		MN	AMN	
C. Negativo	0,00041	0,00538	3200	0,00066	0,00000	4500
Iguazú	0,00294	0,04310	2000	0,00061	0,00000	1700
Pto. Piray	0,00194	0,03548	3100	0,00051	0,00000	2600
Pto. Mineral	0,00200	0,02300	3000	0,00093	0,00000	2200
Posadas	0,00995	0,03554	1400	0,00098	0,00000	1000
C. Positivo	0,00446	0,04503	4200	0,00147	0,00000	2800

Tabla VII: Frecuencias medias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en células de hemolinfa (granulocitos y hialinocitos) de *L. fortunei* expuestas durante 3 días a tratamientos con muestras de agua del Río Paraná y controles durante el año 2009

Tratamiento	Granulocitos		Total células analizadas	Hialinocitos		Total células analizadas
	MN	AMN		MN	AMN	
C. Negativo	0,00202	0,03601	3500	0,00074	0,00000	4300
Iguazú	0,00035	0,00869	3100	0,00168	0,00000	3500
Pto. Piray	0,00000	0,00514	2100	0,00177	0,00000	3700
Pto. Mineral	0,00069	0,01735	2100	0,00196	0,00000	3000
Posadas	0,00288	0,03772	4100	0,00066	0,00000	4500
C. Positivo	0,00311	0,05416	4500	0,00133	0,00000	5200

Tabla VIII: Frecuencias medias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en células de hemolinfa (granulocitos y hialinocitos) de *L. fortunei* expuestas durante 10 días a tratamientos con muestras de agua del Río Paraná y controles durante el año 2009

Tratamiento	Granulocitos		Total células analizadas	Hialinocitos		Total células analizadas
	MN	AMN		MN	AMN	
C. Negativo	0,00081	0,00648	3000	0,00137	0,00000	5000
Iguazú	0,00030	0,00390	3400	0,00124	0,00000	4000
Pto. Piray	0,00316	0,02136	2000	0,00178	0,00000	2200
Pto. Mineral	0,00245	0,01223	1700	0,00249	0,00000	2400
Posadas	0,00181	0,02721	3300	0,00093	0,00000	4300
C. Positivo	0,00311	0,05416	4500	0,00133	0,00000	5200

Tabla IX: Frecuencias medias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en células de hemolinfa (granulocitos y hialinocitos) de *L. fortunei* expuestas durante 3 días a tratamientos con muestras de agua del Río Paraná y controles durante el año 2010

Tratamiento 3 días	Granulocitos		Total células analizadas	Hialinocitos		Total células analizadas
	MN	AMN		MN	AMN	
C. Negativo	0,00202	0,03601	3500	0,00074	0,00000	4300
Iguazú	0,00125	0,03262	2400	0,00212	0,00000	3300
Pto. Piray	0,00603	0,05344	2500	0,00428	0,00000	2800
Pto. Mineral	0,00268	0,03878	4100	0,00396	0,00000	4800
Posadas	0,00138	0,03000	2900	0,00242	0,00000	3300
C. Positivo	0,00311	0,05416	4500	0,00133	0,00000	5200

Tabla X: Frecuencias medias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en células de hemolinfa (granulocitos y hialinocitos) de *L. fortunei* expuestas durante 10 días a tratamientos con muestras de agua del Río Paraná y controles durante el año 2010

Tratamiento 10 días	Granulocitos		Total células analizadas	Hialinocitos		Total células analizadas
	MN	AMN		MN	AMN	
C. Negativo	0,00081	0,00648	3000	0,00137	0,00000	5000
Iguazú	0,00150	0,03850	2000	0,00240	0,00000	2500
Pto. Piray	0,00446	0,02990	2200	0,00446	0,00000	2900
Pto. Mineral	0,00243	0,03459	3700	0,00095	0,00000	4200
Posadas	0,00250	0,03125	3200	0,00184	0,00000	3800
C. Positivo	0,00311	0,05416	4500	0,00133	0,00000	5200

Tabla XI: Frecuencias medias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en células de hemolinfa (granulocitos y hialinocitos) de *L. fortunei* expuestas durante 3 días a tratamientos con muestras de agua del Río Paraná y controles durante el año 2011

Tratamiento 3 días	Granulocitos		Total células analizadas	Hialinocitos		Total células analizadas
	MN	AMN		MN	AMN	
C. Negativo	0,00202	0,03601	3500	0,00074	0,00000	4300
Iguazú	0,00160	0,02880	2500	0,00188	0,00000	3200
Pto. Piray	0,00606	0,05939	3300	0,00189	0,00000	3700
Pto. Mineral	0,00076	0,02536	2600	0,00186	0,00000	4300
Posadas	0,00407	0,03050	2000	0,00240	0,00000	2500
C. Positivo	0,00311	0,05416	4500	0,00133	0,00000	5200

Tabla XII: Frecuencias medias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en células de hemolinfa (granulocitos y hialinocitos) de *L. fortunei* expuestas durante 10 días a tratamientos con muestras de agua del Río Paraná y controles durante el año 2011

Tratamiento 10 días	Granulocitos		Total células analizadas	Hialinocitos		Total células analizadas
	MN	AMN		MN	AMN	
C. Negativo	0,00081	0,00648	3000	0,00137	0,00000	5000
Iguazú	0,00080	0,03173	2500	0,00526	0,00000	3800
Pto. Piray	0,00508	0,05588	2300	0,00230	0,00000	3000
Pto. Mineral	0,00353	0,03111	2800	0,00216	0,00000	3200
Posadas	0,00259	0,02593	2300	0,00248	0,00000	3200
C. Positivo	0,00311	0,05416	4500	0,00133	0,00000	5200

Tabla XIII: Frecuencias medias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en eritrocitos de *S. brevipinna* expuestas durante 3 y 10 días a tratamientos con muestras de agua del Río Paraná y controles durante el año 2009

Tratamiento 3 días	MN	AMN	Total células analizadas	Tratamiento 10 días	MN	AMN	Total células analizadas
C. Negativo	0,0000	0,0014	10000	C. Negativo	0,0001	0,0028	10000
Iguazú	0,0000	0,0020	14000	Iguazú	0,0002	0,0028	16000
Pto. Piray	0,0000	0,0037	10000	Pto. Piray	0,0008	0,0030	10000
Pto. Mineral	0,0004	0,0026	10000	Pto. Mineral	0,0000	0,0016	10000
Posadas	0,0002	0,0021	10000	Posadas	0,0004	0,0124	10000
C. Positivo	0,0005	0,0028	12000	C. Positivo	0,0005	0,0028	12000

Tabla XIV: Frecuencias medias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en eritrocitos de *S. brevipinna* expuestas durante 3 y 10 días a tratamientos con muestras de agua del Río Paraná y controles durante el año 2010

Tratamiento 3 días	MN	AMN	Total células analizadas	Tratamiento 10 días	MN	AMN	Total células analizadas
C. Negativo	0,0000	0,0014	10000	C. Negativo	0,0001	0,0028	10000
Iguazú	0,0001	0,0013	8000	Iguazú	0,0001	0,0009	8000
Pto. Piray	0,0014	0,0166	8000	Pto. Piray	-	-	-(*)
Pto. Mineral	0,0009	0,0125	10000	Pto. Mineral	0,0007	0,0132	6000
Posadas	0,0001	0,0025	10000	Posadas	0,0001	0,0049	10000
C. Positivo	0,0005	0,0028	12000	C. Positivo	0,0005	0,0028	12000

(*) Mortalidad del 50% de ejemplares expuestos entre el quinto y sexto día a este tratamiento

Tabla XV: Frecuencias medias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN) en eritrocitos de *S. brevipinna* expuestas durante 3 y 10 días a tratamientos con muestras de agua del Río Paraná y controles durante el año 2011

Tratamiento 3 días	MN	AMN	Total células analizadas	Tratamiento 10 días	MN	AMN	Total células analizadas
C. Negativo	0,0000	0,0014	10000	C. Negativo	0,0001	0,0028	10000
Iguazú	0,0000	0,0047	8000	Iguazú	0,0000	0,0128	6000
Pto. Piray	0,0002	0,0072	10000	Pto. Piray	0,0005	0,0058	16000
Pto. Mineral	0,0001	0,0057	10000	Pto. Mineral	0,0001	0,0066	12000
Posadas	0,0013	0,0040	8000	Posadas	-	-	-(*)
C. Positivo	0,0005	0,0028	12000	C. Positivo	0,0005	0,0028	12000

(*) Mortalidad del 100% de los ejemplares expuestos entre el segundo y quinto día a este tratamiento: 4 de ellos fueron procesados post-mortem al segundo y tercer día de exposición

Tabla XVI: Ensayos de recuperación de daños en el ADN de granulocitos de *C. fluminea* luego de bioensayos de tres días de exposición a muestras de agua del río Paraná en el año 2011, expresados como frecuencias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN)

Sitios de muestreo	Tratamiento 3 días		Recuperación 5 días		Recuperación 10 días		Total células analizadas
	MN	AMN	MN	AMN	MN	AMN	
Pto. Piray	0,0096	0,0507	0,0019	0,0306	0,0010	0,0170	2600
Pto. Mineral	0,0031	0,0400	0,0032	0,0279	0,0000	0,0209	2500

Tabla XVII: Ensayos de recuperación de daños en el ADN de hialinocitos de *C. fluminea* luego de bioensayos de tres días de exposición a muestras de agua del río Paraná en el año 2011, expresados como frecuencias de Micronúcleos (MN)

Sitios de muestreo	Tratamiento 3 días	Recuperación 5 días	Recuperación 10 días	Total células analizadas
	MN	MN	MN	
Pto. Piray	0,0016	0,0008	0,0000	2600
Pto. Mineral	0,0022	0,0009	0,0000	2500

Tabla XVIII: Ensayos de recuperación de daños en el ADN de granulocitos de *C. fluminea* luego de bioensayos de diez días de exposición a muestras de agua del río Paraná en el año 2011, expresados como frecuencias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN)

Sitios de muestreo	Tratamiento 10 días		Recuperación 5 días		Recuperación 10 días		Total células analizadas
	MN	AMN	MN	AMN	MN	AMN	
Pto. Piray	0,0019	0,0355	0,0045	0,0409	0,0013	0,0166	3300
Pto. Mineral	0,0020	0,0230	0,0000	0,0344	0,0000	0,0250	3200

Tabla XIX: Ensayos de recuperación de daños en el ADN de hialinocitos de *C. fluminea* luego de bioensayos de diez días de exposición a muestras de agua del río Paraná en el año 2011, expresados como frecuencias de Micronúcleos (MN)

Sitios de muestreo	Tratamiento 10 días		Recuperación 5 días		Recuperación 10 días		Total células analizadas
	MN	MN	MN	MN	MN	MN	
Pto. Piray	0,0005		0,0018		0,0000		3300
Pto. Mineral	0,0009		0,0009		0,0000		3200

Tabla XX: Ensayos de recuperación de daños en el ADN de granulocitos de *L. fortunei* luego de bioensayos de tres días de exposición a muestras de agua del río Paraná en el año 2011, expresados como frecuencias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN)

Sitios de muestreo	Tratamiento 3 días		Recuperación 5 días		Recuperación 10 días		Total células analizadas
	MN	AMN	MN	AMN	MN	AMN	
Pto. Piray	0,0061	0,0594	0,0077	0,0399	0,0000	0,0235	2500
Pto. Mineral	0,0008	0,0254	0,0021	0,0198	0,0000	0,0119	2000

Tabla XXI: Ensayos de recuperación de daños en el ADN de hialinocitos de *L. fortunei* luego de bioensayos de tres días de exposición a muestras de agua del río Paraná en el año 2011, expresados como frecuencias de Micronúcleos (MN)

Sitios de muestreo	Tratamiento 3 días		Recuperación 5 días		Recuperación 10 días		Total células analizadas
	MN	MN	MN	MN	MN	MN	
Pto. Piray	0,0019		0,0024		0,0000		2500
Pto. Mineral	0,0019		0,0010		0,0000		2000

Tabla XXII: Ensayos de recuperación de daños en el ADN de granulocitos de *L. fortunei* luego de bioensayos de diez días de exposición a muestras de agua del río Paraná en el año 2011, expresados como frecuencias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN)

Sitios de muestreo	Tratamiento 10 días		Recuperación 5 días		Recuperación 10 días		Total células analizadas
	MN	AMN	MN	AMN	MN	AMN	
Pto. Piray	0,0051	0,0559	0,0030	0,0530	0,0020	0,0244	2800
Pto. Mineral	0,0035	0,0311	0,0007	0,0190	0,0000	0,0197	2300

Tabla XXIII: Ensayos de recuperación de daños en el ADN de hialinocitos de *L. fortunei* luego de bioensayos de diez días de exposición a muestras de agua del río Paraná en el año 2011, expresados como frecuencias de Micronúcleos (MN)

Sitios de muestreo	Tratamiento 10 días		Recuperación 5 días		Recuperación 10 días		Total células analizadas
	MN	AMN	MN	AMN	MN	AMN	
Pto. Piray	0,0023		0,0023		0,0015		2800
Pto. Mineral	0,0022		0,0011		0,0005		2300

Tabla XXIV: Ensayos de recuperación de daños en el ADN de eritrocitos de *S. brevipinna* luego de bioensayos de tres días de exposición a muestras de agua del río Paraná en el año 2011, expresados como frecuencias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN)

Sitios de muestreo	Tratamiento 3 días		Recuperación 5 días		Recuperación 10 días		Recuperación 15 días		Total células analizadas
	MN	AMN	MN	AMN	MN	AMN	MN	AMN	
Pto. Piray	0,0002	0,0072	0,0006	0,0051	0,0003	0,0015	-	-	14000
Pto. Mineral	0,0001	0,0057	0,0005	0,0028	0,0003	0,0013	0,0003	0,0027	16000

Tabla XXV: Ensayos de recuperación de daños en el ADN de eritrocitos de *S. brevipinna* luego de bioensayos de diez días de exposición a muestras de agua del río Paraná en el año 2011, expresados como frecuencias de Micronúcleos (MN) y Alteraciones de la Morfología Nuclear (AMN)

Sitios de muestreo	Tratamiento 10 días		Recuperación 5 días		Recuperación 10 días		Recuperación 15 días		Total células analizadas
	MN	AMN	MN	AMN	MN	AMN	MN	AMN	
Pto. Piray	0,0005	0,0057	0,0008	0,0025	0,0003	0,0022	-	-	16000
Pto. Mineral	0,0001	0,0066	0,0003	0,0045	0,0003	0,0032	0,0003	0,0037	20000

Tabla XXVI: Frecuencias de MN y AMN en células CHO-K1 expuestas *in vitro* durante 15 hs. a muestras de agua del río Paraná durante el año 2009.

Tratamiento 15 hs	MN	AMN	Total células analizadas
C. Negativo	0,0051	0,0023	6000
Iguazú	0,0051	0,0033	6000
Pto. Piray	0,0056	0,0031	6000
Pto. Mineral	0,0068	0,00316	6000
Posadas	0,0058	0,0026	6000
C. Positivo	0,0193	0,009	6000

Tabla XXVII: Frecuencias de MN y AMN en células CHO-K1 expuestas *in vitro* durante 15 hs. a muestras de agua del río Paraná durante el año 2010.

Tratamiento 15 hs	MN	AMN	Total células analizadas
C. Negativo	0,0051	0,0023	6000
Iguazú	0,0088	0,0061	6000
Pto. Piray	0,0100	0,0076	6000
Pto. Mineral	0,0123	0,008	6000
Posadas	0,0080	0,0043	6000
C. Positivo	0,0193	0,009	6000

Tabla XXVIII: Frecuencias de MN y AMN en células CHO-K1 expuestas *in vitro* durante 15 hs. a muestras de agua del río Paraná durante el año 2011.

Tratamiento 15 hs	MN	AMN	Total células analizadas
C. Negativo	0,0043	0,0036	6000
Iguazú	0,0118	0,007	6000
Pto. Piray	0,0123	0,0076	6000
Pto. Mineral	0,0110	0,0036	6000
Posadas	0,0096	0,0045	6000
C. Positivo	0,0143	0,0088	6000