

Evaluación de la genotoxicidad de las aguas costeras de Chile central sobre los peces *Mugil cephalus* y *Odontesthes brevianalis*

Assessment of genotoxicity of coastal waters of central Chile on fishes *Mugil cephalus* and *Odontesthes brevianalis*

Hernán Gaete Olivares,^{1,3} Rosa Guerra Muñoz,²
Diana Carvajal Vásquez,¹ Macarena Mukarker Valladares¹
y Gabriela Lobos Valenzuela^{3,4}

¹ Instituto de Ciencias Ambientales. Universidad de Valparaíso. Av. Gran Bretaña 1111, Playa Ancha, Valparaíso, Chile

² Instituto de Biología

³ Centro de Investigación y Gestión de Recursos Naturales (CIGREN)

⁴ Instituto de Química y Bioquímica, Facultad de Ciencias.
e-mail: hernan.gaete@uv.cl

Gaete Olivares H., R. Guerra Muñoz, D. Carvajal Vásquez, M. Mukarker Valladares, G. Lobos Valenzuela. 2014. Evaluación de la genotoxicidad de las aguas costeras de Chile central sobre los peces *Mugil cephalus* y *Odontesthes brevianalis*. *Hidrobiológica* 24 (3): 271-279.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la genotoxicidad de las aguas de las desembocaduras de los ríos Aconcagua, Maipo y el estero Catapilco sobre las especies de peces *Mugil cephalus* y *Odontesthes brevianalis*. Se midieron *in situ* los parámetros de pH, conductividad, oxígeno disuelto y sólidos disueltos totales. Se determinó las concentraciones de cobre, zinc y plomo en aguas y tejido branquial. En peces, la genotoxicidad se determinó a través del ensayo cometa y la frecuencia de micronúcleos. Los resultados muestran que el cobre total en aguas fue más alto en el estero Catapilco, seguido del río Maipo. El plomo, fue más alto en el río Maipo, en tanto que, los mayores niveles de zinc se registraron en el río Aconcagua. En branquias, el zinc fue el metal que se encontró en mayor concentración en ambas especies. El plomo fue más alto en *M. cephalus* en el río Maipo, en tanto, el cobre fue más alto en la misma especie en el río Aconcagua. El daño genético más alto, se observó en ambas especies de peces del río Maipo. El menor daño genético fue en *O. brevianalis* del río Aconcagua. No se encontró correlación entre daño genético y concentración de metales en branquias. Los tres cuerpos de agua contienen agentes químicos en concentraciones biodisponibles, que provocan daño genético en peces.

Palabras clave: Ensayo cometa, metales pesados, micronúcleos, residuos antropogénicos

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the genotoxicity of the surface waters of mouths of the rivers Aconcagua, Maipo and Catapilco stream on fish *Mugil cephalus* and *Odontesthes brevianalis*. In the waters of these rivers and stream *in situ*, the parameters pH, conductivity, dissolved oxygen, total dissolved solids were measured. The concentration of copper, zinc and lead were measured in water and gills tissue. The genotoxicity was determined through the comet assay and micronucleus frequency. The results show that copper concentration in water was higher in the

Catapilco stream followed by the Maipo river. The lead concentration was higher in the Maipo river, while that zinc was higher in the Aconcagua river. The zinc concentration in gills was greater than copper and lead in both species. The lead concentration was higher in *M. cephalus* in the Maipo river, while the copper was in the same species but in the Aconcagua river. The highest genetic damage was observed in both species of fish of the Maipo River. The lowest genetic damage was in *O. brevianalis* from Aconcagua river. No relationship was found between genetic damage and concentration of metals in gills. In conclusion the surface waters of the mouths of Aconcagua and Maipo rivers, and Catapilco stream contains chemical agents that provoke genotoxicity in fishes.

Key words: Anthropogenic residues, comet assay, heavy metals, micronuclei.

INTRODUCCIÓN

Los ríos presentan crecientes procesos de contaminación debido a las diferentes actividades antrópicas que se desarrollan en su cuenca. Entre ellas, agrícolas, industriales, fundiciones y desarrollo urbano. Estas actividades generan una gran variedad de residuos los cuales llegan directa e indirectamente a estos cuerpos de agua. Estos residuos contienen, entre otros, metales, los cuales a diferencia de la materia orgánica, no sufren degradación biológica ni química en la naturaleza, son persistentes y se bioacumulan en los organismos de las tramas tróficas acuáticas. Una parte de estos residuos, se concentra en la zona de la desembocadura, denominada estuario (Tapia *et al.*, 2009). Esta zona se caracteriza por ser un lugar de alta productividad biológica y biodiversidad acuática (Banks *et al.*, 2005; Ait Alla *et al.*, 2006; Tapia *et al.*, 2009; Díaz-Jaramillo *et al.*, 2010).

Los metales como el cobre, zinc y plomo son de particular interés ecotoxicológico debido a que se asocian a los residuos mencionados anteriormente. El plomo, no es considerado elemento esencial, aunque se acumula en los organismos, no se le conoce función. Por otra parte, cobre y zinc son elementos esenciales, específicamente para la función estructural de biomoléculas y como catalizadores del metabolismo celular, llegando a activar más de 300 enzimas y regulando una serie de mecanismos moleculares asociados a funciones vitales, tales como: intercambio de información hormonal, transducción de señales, transporte de electrones en la respiración celular y foto fosforilación, y en la dinámica de los ácidos nucleicos (Moreno, 2003; Srivastava *et al.*, 2006; Cakmak & Marschner, 1988). Sin embargo, la exposición a altas concentraciones de estos metales, puede llegar a ser tóxica para los organismos acuáticos. Los metales, en general, tienden a bioacumularse y a unirse de forma covalente a macromoléculas como proteínas y ADN. Esta unión, genera estrés oxidativo que provoca inhibición de los mecanismos de reparación del ADN, debido a la formación de fragmentos por rupturas en las hebras de la doble hélice (Srivastava *et al.*, 2006; Fevzi *et al.*, 2007).

Para proteger a los organismos que habitan estos ecosistemas acuáticos de los efectos tóxicos de los metales, se han establecido normas y/o regulaciones ambientales basadas en concentraciones totales máximas permisibles de estos agentes químicos en forma individual. Sin embargo, esta aproximación, no

garantiza protección de los organismos debido a que la toxicidad de los agentes químicos podría estar afectada por factores físicos y químicos, como: pH, dureza, y materia orgánica (De Schamphe-laere & Janssen, 2004). Además, las interacciones que ocurren entre los metales u otros agentes químicos como plaguicidas, hidrocarburos en la mezcla, pueden ser sinérgicas, antagónicas o aditivas (Faust *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2004).

Lo anterior, ha llevado a proponer el uso de los biomarcadores a niveles moleculares y celulares que evalúan el efecto de los agentes químicos, antes de que se manifiesten a niveles de organización superiores (individuo, población) (Orieux *et al.*, 2011; Papis *et al.*, 2011). Entre estas herramientas de alerta temprana tenemos al ensayo denominado "The Single Cell Gel Electrophoresis" (SCGE), conocido como ensayo cometa (Collins *et al.*, 1995), utilizado para detectar el daño que producen en el ADN una serie de agentes contaminantes denominados genotóxicos (Rajaguru *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2004; Egito *et al.*, 2010; Liman *et al.*, 2011; Mohanty *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Otra prueba de daño genético, es la formación de micronúcleos (MN), descrito inicialmente por Schmid (1975) y en la actualidad utilizado como un método simple y alternativo, para evaluar el daño a nivel cromosómico. Su aplicación corresponde a una prueba citogenética, que permite evaluar los efectos de tipo clastogénicos (rupturas cromosómicas) y aneugénicos (variaciones en el 2n), ocurridos previamente durante la mitosis de poblaciones celulares en renovación. Los MN son la expresión citoplasmática de un fragmento cromosómico heterocromático y acéntrico durante la interfase celular, ocurrido por la pérdida de los centrómeros, fenómeno que se presenta durante la disyunción de las cromátidas hermanas en la anafase mitótica (Koukozika & Dimitriadis, 2005; Ergene *et al.*, 2007).

Las cuencas de los ríos Aconcagua y Maipo (Chile central) presentan importantes actividades antrópicas como: mineras, industriales, agrícolas y asentamientos urbanos. Estas generan residuos que contienen metales como cobre, zinc, hierro, manganeso, arsénico y plomo, entre otros. Pizarro *et al.* (2010), en su estudio sobre la variación espacial y temporal de metales en ríos de Chile, sugieren que la contaminación proveniente de la minería, es el principal proceso que contribuye e incrementa la tendencia anual de As, Cu y SO_4^{-2} en la zona centro-norte de Chile. Entre los

organismos que pueden ser afectados por estos metales están los peces, los cuales son importantes componentes en las tramas tróficas de estos ecosistemas, generándose biomagnificación de estos agentes químicos. Para la determinación del riesgo ecológico en la fauna íctica, es fundamental conocer la relación entre la exposición a esos metales y los efectos de las aguas de estos cuerpos sobre la fauna íctica. En esta investigación se postula que las aguas de las desembocaduras de los ríos Aconcagua y Maipo, contienen agentes químicos en concentraciones biodisponibles que provocan genotoxicidad en la fauna íctica que allí habita. Es por ello, que el objetivo fue evaluar la genotoxicidad de las aguas de las desembocaduras de los ríos Aconcagua, Maipo y del Estero Catapilco, utilizando como organismos bioindicadores a los peces *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) y *Odontesthes brevianalis* (Günther, 1880).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. La cuenca hidrográfica del río Maipo abarca una superficie de 15,304 km². La superficie de la cuenca, cubre prácticamente el 100% de la Región Metropolitana y una mínima superficie de las Regiones de Valparaíso (Provincia de San Antonio y Valparaíso) y del Libertador Bernardo O'Higgins (Provincia de Cachapoal). La población total en la cuenca es 4,668,473 habitantes. El caudal promedio anual de 99 m³/s. La cuenca del río Aconcagua se desarrolla en el extremo sur de la zona de los Valles Transversales o Semiárida, en la V Región de Valparaíso.

Su extensión alcanza a 7,340 km². Sus más caudalosos afluentes los recibe por la ribera norte y todos sus tributarios formativos asientan sus cabeceras en el interior de la cordillera andina en un sector donde ésta alcanza elevaciones excepcionales, como son los cerros Juncal (6,110 m); Alto de los Leones o Cabeza de León (5,400 m.) y el macizo del Aconcagua (7,021 m). Presenta un caudal promedio anual de 32 m³/s (MOP, 2004a, b) (Fig. 1). En este estudio se seleccionó el estero Catapilco, localizado en la Región de Valparaíso como sitio de referencia debido a la menor actividad antrópica que presenta su cuenca, de 318 Km² y un caudal promedio anual < 1 m³/s.

Biomonitores. Los peces biomonitores fueron *Mugil cephalus* y *Odontesthes brevianalis*. Los individuos de las especies *M. cephalus*, se conocen como pez *lisa* e internacionalmente como *Flat-head mullet striped*, cuya familia es una de las más extendidas en el mundo; en tanto que *O. brevianalis*, conocido como *cauque*, especie endémica de Chile, se extiende desde la Serena (IV Región) hasta Puerto Montt (X Región). Los ejemplares fueron capturados con red, en la tabla 1 se muestran la talla y peso de los individuos obtenidos mediante pesca con red en los dos ríos y estero.

Medición de parámetros físico-químicos en las muestras de agua. En cada sitio de muestreo se midió *in situ* en el agua superficial en período de baja marea: la temperatura, pH, conductividad eléctrica, oxígeno disuelto y sólidos disueltos totales, con un equipo multiparámetro (Hanna HI 98130). El muestreo de aguas y

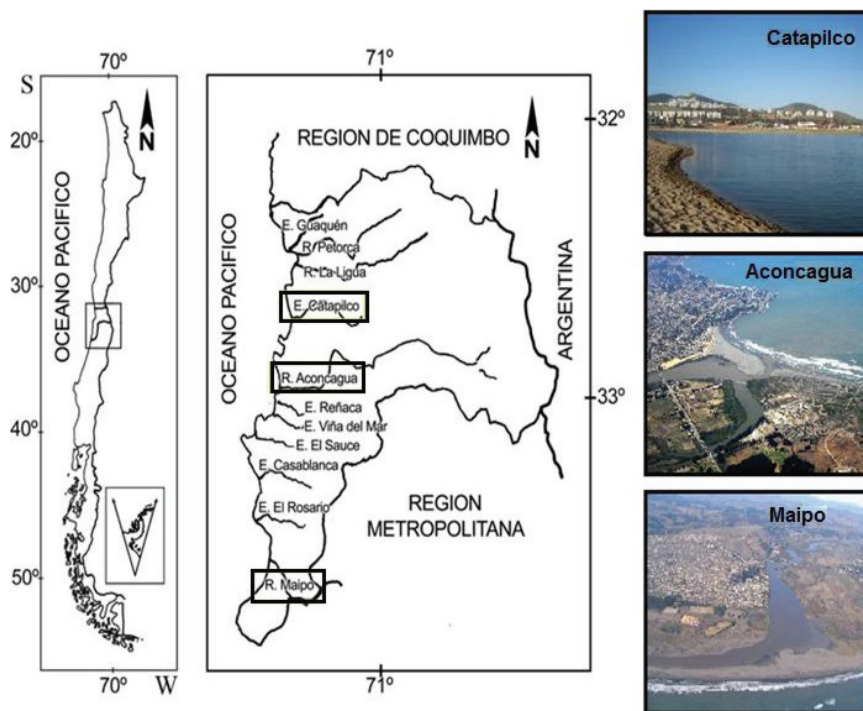


Figura 1. Ubicación de las desembocaduras del Estero de Catapilco y los ríos Aconcagua y Maipo.

Tabla 1. Promedio (X) \pm D.S. de la masa corporal y de la longitud en *Mugil cephalus* y *Odontesthes brevianalis*.

Desembocadura	Especies	Masa Corporal (g)	Longitud (cm)
Río Aconcagua	<i>M. cephalus</i> L	20.8 \pm 3.2	11.8 \pm 0.8
	<i>O. brevianalis</i>	25.1 \pm 2.9	13.8 \pm 0.9
Río Maipo	<i>M. cephalus</i> L	27.8 \pm 3.8	12.8 \pm 1.1
	<i>O. brevianalis</i>	26.8 \pm 2.5	15.1 \pm 0.5
Estero Catapilco	<i>O. brevianalis</i>	40.5 \pm 2.7	16.2 \pm 1.9

peces realizó en período de baja marea entre octubre y diciembre de 2011.

Determinación de metales en aguas y tejido en peces. Las muestras de agua se tomaron superficialmente, en envases plásticos de alta densidad que contenían ácido nítrico. Las muestras de tejido branquial se tomaron en terreno mediante disección y fueron transportadas refrigeradas a 4 °C al laboratorio en envases plásticos hasta su análisis. Las concentraciones de los metales cobre, zinc y plomo, se determinaron en el agua y en tejido branquial de los peces, a través de espectrofotometría de absorción atómica acoplado a horno de grafito. El material certificado de referencia utilizado para tejido fue CRM 278 tejido de molusco (*Mytilus edulis* Linnaeus, 1758) y para metales traza en aguas SRM 1643e (Tabla 2).

Obtención de muestras de sangre en peces. La obtención de las células sanguíneas para realizar las pruebas de genotoxicidad, relacionadas con la presencia de micronúcleos y formación de cometas, se realizó mediante una disección abdominal desde la aleta pectoral hasta el opérculo, se obtuvieron dos frotis de sangre por individuo y uno para ensayo de cometa. La sangre se extrajo con capilares heparinizados y luego se almacenaron a 4 °C (Simoniello, 2009). Las muestras fueron procesadas inmediatamente llegadas al laboratorio.

Prueba de viabilidad celular. A partir de muestras de sangre se realizó la prueba propuesta por Jha *et al.* (2005), para lo cual, las

células se tiñeron con el colorante Eosina Y 0.2% en solución Ringer, el cual tiñe sólo las células muertas.

Ensayos de genotoxicidad. a) El registro de la evaluación de la inducción de micronúcleos (MN), se realizó sólo en *O. brevianalis*, ya que en la desembocadura del Estero Catapilco no se obtuvieron ejemplares de *M. cephalus*. Para ello se prepararon dos esparcidos de sangre por individuo, se fijaron con una solución de metanol: ácido acético glacial (3:1) y se dejaron secar al aire. La tinción se realizó con una gota de azul de toluidina al 0.25% en agua destilada. La identificación de los micronúcleos se realizó según Fenech *et al.* (2003), para lo cual se contaron 4,000 eritrocitos correspondientes a dos frotis por réplica (n = 3). b) El ensayo cometa según Singh *et al.* (1988), se realizó en ambas especies, a excepción de *M. cephalus* en el Estero Catapilco. Las muestras de sangre de los peces, después de la electroforesis, fueron teñidas con 10 mL de bromuro de etidio sobre el porta objeto y luego mantenidas en oscuridad por 20 minutos hasta la observación. Se utilizó un microscopio de epifluorescencia, equipado con un filtro de excitación de 480-550 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Para la evaluación de la alteración del material nucleico, se consideró la longitud de la cola del cometa (Collins *et al.*, 1995), el cual se categoriza en estados de 0 a 4 acorde al grado de daño (Tabla 3). La magnitud del daño fue expresada en unidades arbitrarias (UA), con valoraciones posibles en un rango de 0-400, de acuerdo a la siguiente fórmula: CTM

Tabla 3. Ensayo cometa: categorización de los estados del cometa e interpretación del grado de daño genotóxico acorde a la longitud de la cola (Brugués & Reguero, 2007).

Estados y longitud de la cola		Interpretación
Estados	Longitud (μ m)	Grados de Toxicidad
0	0-24	No genotóxico
1	25-32	Ligeramente genotóxico
2	33-40	Moderadamente genotóxico
3	41-53	Altamente genotóxico
4	Mayor de 53	Extremadamente genotóxico

Tabla 2. Control de calidad de las determinaciones de concentraciones de metales en tejidos y aguas.

		Pb	Cu	Zn
BCR CRM 278	Valor encontrado (mg Kg ⁻¹ peso seco)	2.10 \pm 0.05	9.80 \pm 0.5	86 \pm 30
	Valor certificado (mg Kg ⁻¹ peso seco)	2.00 \pm 0.04	9.45 \pm 0.13	83.1 \pm 1.7
SRM 1643e	Valor encontrado (μ g L ⁻¹)	19.2 \pm 0.5	24 \pm 1	81 \pm 4
	Valor certificado (μ g L ⁻¹)	49.15 \pm 0.20	22.76 \pm 0.31	78.5 \pm 2.2

(conteo total de la muestra) = [(% de células en clase 0) x 0] + [(% de células en clase 1) x 1] + [(% de células en clase 2) x 2] + [(% de células en clase 3) x 3] + [(% de células en clase 4) x 4] (Fig. 4). Las imágenes microscópicas de los ensayos realizados, fueron tomadas con una cámara fotográfica digital "Cannon 7 pixeles".

La comparación de las variables: frecuencia de micronúcleos y daño genético en ambas especies entre los ríos y estero, se realizó a través del análisis ANOVA, Tukey al 5% de probabilidad ($p < 0.05$). Previamente se realizó un análisis de homogeneidad de varianzas. Para correlacionar las variables biológicas con las concentraciones de los metales medidos en branquias, se utilizó el análisis de correlación de Pearson ($p < 0.05$). Los datos fueron analizados a través del programa SYSTAT versión 5.0 copyright 1990-1992 SYSTAT, INC.

RESULTADOS

Parámetros físicoquímicos y concentración de metales totales en agua: El pH en los tres cuerpos de agua fue alcalino, siendo el más alto en las aguas del estero Catapilco y el más bajo en el río Maipo. La conductividad y sólidos disueltos totales fueron más altos en el estero Catapilco, la concentración de oxígeno disuelto fue similar en los tres cuerpos de agua. La concentración de cobre total en agua fue más alta en el estero Catapilco seguido del Maipo. La concentración de plomo fue más alta en el río Maipo, en tanto que el zinc fue en el río Aconcagua (Tabla 4).

Concentraciones de metales en branquias. El zinc, es el metal que presentó la mayor concentración en ambas especies de peces. En tanto que el plomo, fue más alto en *M. cephalus* en el

río Maipo. La mayor concentración de cobre, se encontró en la misma especie en el río Aconcagua (Tabla 5).

Viabilidad celular de los eritrocitos. Los peces en las desembocaduras tuvieron una viabilidad del 81% en el río Aconcagua; 84% en el río Maipo y del 100% en el estero Catapilco.

Genotoxicidad. a) Ensayo cometa: se observa que el daño genético fue más alto en los peces de la desembocadura del río Maipo, tanto en *M. cephalus* como en *O. brevianalis*, siendo los estados III y IV de daño los que presentaron los mayores porcentajes en ambas especies. En el río Aconcagua el estado I de daño presentó el mayor porcentaje en ambas especies. En el estero de Catapilco el daño en *O. brevianalis*, el estado II presentó el mayor porcentaje de daño (Tabla 6). **b) Micronúcleos:** La mayor frecuencia fue en el río Maipo, seguido del río Aconcagua en *O. brevianalis* (Fig. 2). Éstos se muestran en un esparcido celular (Fig. 3). La correlación más alta entre el daño genético y la concentración de metales fue con cobre, en *O. brevianalis* ($r: 0.48$) aunque no fue significativa.

DISCUSIÓN

Las diferencias en las características físicas y químicas entre las aguas de las desembocaduras de los ríos Aconcagua, Maipo y el Estero Catapilco, estarían determinadas por las diferencias en los caudales, grado de antropización, características orográficas y geológicas de las cuencas de estos ríos y estero (Pizarro *et al.*, 2010). En este sentido, tanto las concentraciones de sólidos disueltos totales como la conductividad, que fueron más altos en el estero de Catapilco, se podrían deber a que los caudales de los ríos Aconcagua y Maipo son mayores que el del Estero Catapilco.

Tabla 4. Parámetros físicoquímicos y concentración de metales totales en las muestras de agua.

Ríos y estero	Temperatura °C	pH	Conductividad eléctrica (dS/m)	Sólidos disueltos (ppm)	Oxígeno disuelto (ppm)	Cu (mg/l)	Pb (mg/l)	Zn (mg/l)
Aconcagua	18.5 °C	8.5	22.5	1900	10.4	<0.005	0.07	0.065
Maipo	19.7 °C	8.2	12.8	650	9.8	0.016	0.18	0.019
Catapilco	22.8 °C	8.8	50.4	250	9.9	0.028	<0.01	0.013

Tabla 5. Promedios de concentración (mg Kg⁻¹) y desviación estándar de metales en branquias de peces en las desembocaduras de tres cuerpos de agua de Chile.

	Río Aconcagua		Río Maipo		Estero Catapilco
	<i>M. cephalus</i> (n = 6)	<i>O. brevianalis</i> (n = 6)	<i>M. cephalus</i> (n = 4)	<i>O. brevianalis</i> (n = 4)	<i>O. brevianalis</i> (n = 4)
Cu	2.6 ± 0.7	1.3 ± 0.6	<1.5	< 1.5	1.6 ± 0.49
Pb	1.9 ± 0.6	7.7 ± 8.2	1.7 ± 0.36	1.8 ± 0.36	<1.5
Zn	15.8 ± 2.2	24 ± 12.9	15 ± 0.98	35 ± 5.1	30.6 ± 4.6

Tabla 6. Ensayo Cometa. Promedios de frecuencia celular en cada estado (0 al 4) y conteo total muestra (CTM) y desviación estándar. Las letras diferentes (a, b y c) indican diferencias significativas respecto al CTM entre especies y el (*) indica diferencias significativas respecto a la frecuencia de células en clase 0 por especie ($p < 0.05$).

Desembocadura	Estados de genotoxicidad					Daño en células (%)	CTM
	0	1	2	3	4		
Aconcagua							
<i>M. cephalus</i>	13 ± 4.09	29.6 ± 7.73*	24.5 ± 2.50*	23.33 ± 6.53*	9.5 ± 6.31	86.9 ± 4.09 ^a	186.6 ± 20.1 ^a
<i>O. brevianalis</i>	19 ± 2.75	36.16 ± 9.7*	24.16 ± 9.6	16.16 ± 9.41	4.16 ± 4.08*	80.6 ± 2.75 ^c	153.6 ± 25.1 ^c
Maipo							
<i>M. cephalus</i>	0 ± 0	0 ± 0	3 ± 4	35.8 ± 11.1*	61.2 ± 13*	100 ± 0 ^b	358.1 ± 15.8 ^b
<i>O. brevianalis</i>	0 ± 0	3 ± 3.55	14.75 ± 7.8*	32 ± 4.96*	50.25 ± 8.05*	100 ± 0 ^b	329.5 ± 8.7 ^b
Catopilco							
<i>O. brevianalis</i>	0 ± 0	11.5 ± 3.72*	84.33 ± 4.96*	3 ± 2.19	0.5 ± 0.54	99.3 ± 0 ^a	189 ± 2.5 ^a

Además, en el período de estudio, las aguas del estero Catopilco en la desembocadura, formaban una laguna sin salida al mar. En relación al pH, los dos ríos y el estero presentan un pH alcalino, valores similares han sido reportados en MOP (2004a, b) y Gaete et al. (2007). Otros ríos en Chile que presentan valores similares de pH son el río Elqui (IV Región) y río Cachapoal (VI Región) (Richtera et al., 2004; Guevara et al., 2006). Esto podría estar asociado a las características geológicas similares por las que escurren estos ríos y esteros. Los valores de pH están dentro del rango de la conservación acuática (INN, 1987).

En cuanto a las concentraciones de metales en aguas, la mayor concentración de cobre en el estero de Catopilco, puede ser por la menor dilución que presentó este estero al momento del estudio en comparación con los ríos Aconcagua y Maipo. Por otra parte, podría ser debido a la depositación atmosférica de material particulado, proveniente de una fundición de cobre,

localizada aproximadamente a 8 km de distancia en dirección del viento sur-este (Lazo et al., 2006). La concentración de cobre en el río Aconcagua fue menor a la señalada por MOP (2004b), en tanto que en el Maipo estuvieron en el rango a las determinadas por MOP (2004a). La mayor concentración de plomo se encontró en el río Maipo, esta fue superior a la reportada por MOP (2004a), lo cual se podría deber al aumento de los aportes de industrias y transporte en el período de casi una década, en la zona de la región metropolitana de Santiago. En las aguas de la desembocadura del río Aconcagua, se presentaron las menores concentraciones de plomo, lo que se puede deber al mayor caudal que presentó al momento del muestreo. El río Aconcagua es de régimen mixto, presentando entre los meses de diciembre y enero su mayor

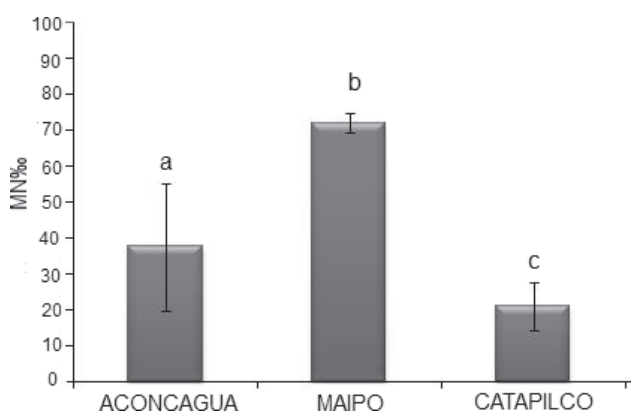


Figura 2. Frecuencia de micronúcleos (MN,‰) en eritrocitos de *O. brevianalis* capturados en la desembocadura de los ríos Aconcagua, Maipo y Estero de Catopilco. Las letras a, b y c, indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

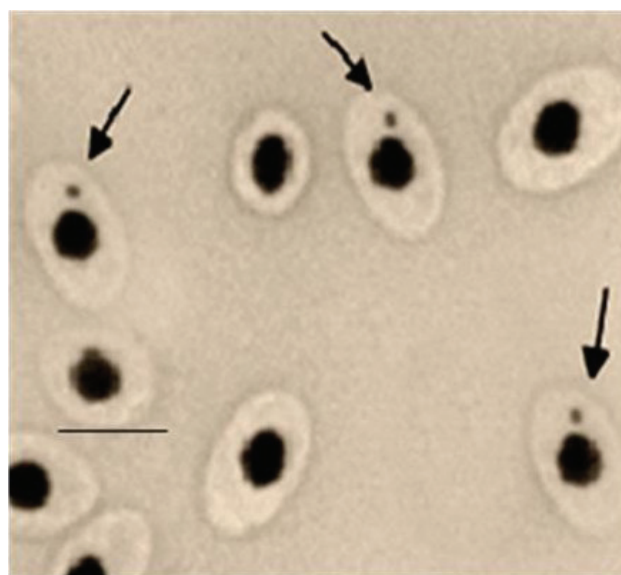


Figura 3. Eritrocitos maduros: presencia de micronúcleos (flechas) en *O. brevianalis*. Barra: 7.2 µm.

caudal por el deshielo de la cordillera (Gaete *et al.*, 2007). Por otra parte, la concentración de zinc, fue mayor en el río Aconcagua, esto podría estar asociado a la depositación de material particulado proveniente de una planta refinadora de petróleo cercana a la zona de estudio. Al comparar estos valores con la norma chilena (INN, 1987), están bajo el máximo permitido para la protección de la biodiversidad acuática.

En el tejido branquial la concentración de cobre fue menor que el zinc y plomo, indicando una menor biodisponibilidad, la cual podría relacionarse con el pH alcalino de las aguas, generando especies químicas de cobre no bioacumulables. Esto concuerda con lo señalado por Moreno (2003) en cuanto a que el cobre presenta baja tendencia a la bioacumulación en organismos acuáticos, a excepción de los organismos filtradores como los moluscos. El cobre tiende a acumularse en el hígado donde se excreta por vía biliar. También presenta baja tendencia a unirse a proteínas como las metalotioneínas, a diferencia del zinc que tiene mayor tendencia a unirse a proteínas plasmáticas y por tanto a bioacumularse. Sin embargo, las concentraciones de cobre en las branquias son similares a las reportadas por Tapia *et al.* (2009), aunque en músculo de *M. cephalus* de 5-36.2 mg kg⁻¹ y 0.6-23.2 mg kg⁻¹ en los estuarios de los ríos Maule y Mataquito, respectivamente. La mayor concentración de zinc y plomo, sería porque tendrían mayor facilidad para atravesar las membranas celulares en las branquias, lo cual ha sido reportado para cadmio y cromo en branquias de pejerrey (Carriquiriborde & Ronco, 2008).

La bioacumulación del plomo fue menor al zinc. Esto podría deberse a que el plomo tiende a bioacumularse más en otros tejidos como el hígado, seguido de las branquias y en concentraciones muy inferiores en el músculo. En un estudio realizado por Lozada-Zárate *et al.* (2007), no detectaron plomo en branquias,

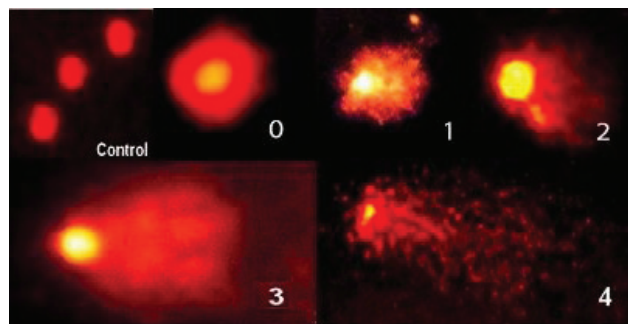


Figura 4. Clasificación morfológica cualitativa de los estados de la longitud del cometa y frecuencia de lesiones en el ADN. Control: núcleos sin daño. Grado 0: casi sin frecuencia de lesiones (<5%); Grado 1: mínima frecuencia de daño bajo (5-10%); Grado 2: daño medio (10-40%); Grado 3: frecuencia alta de lesiones (40-95%); Grado 4: daño total; la cabeza del cometa se ha reducido, destacándose un incremento de la migración de fragmentos.

únicamente se registró en piel y huesos. Sin embargo, en Tapia *et al.*, (2009) las concentraciones de plomo en músculo son del mismo orden de magnitud que en este estudio, ellos reportan 0.4-11.2 mg Kg⁻¹ y 0.4-11.1 mg Kg⁻¹ en los estuarios de los ríos Maule y Mataquito, respectivamente.

En branquias, el zinc presentó la mayor concentración en ambas especies. Esto sugiere una mayor biodisponibilidad de este metal. Algunos metales tienden a formar complejos con el mucus de las lamelas branquiales, lo que favorecería su acumulación respecto a otros (Yilmaz *et al.*, 2007). En un estudio realizado por Orioux *et al.* (2011), encontraron que al comparar la bioacumulación entre zinc y cadmio en branquias de Zebrafish, el zinc presentó una mayor bioacumulación significativa. En nuestro estudio se observó una tendencia similar entre zinc comparado con cobre y plomo.

Otro factor que podría explicar las diferencias de las concentraciones de los metales en las branquias entre los peces, son los diferentes hábitos alimentarios (Romeoa *et al.*, 1999), necesidades ecológicas, metabolismo, edad, tamaño y longitud de los peces y sus hábitats (Canli & Atli, 2003). Las diferencias de bioacumulación de los tejidos se han atribuido a las características biológicas de la especie y al modo de exposición del individuo a un determinado metal. También si la exposición es aguda o crónica, o cual es la ruta principal de ingreso contaminante. Si es a través del agua, la mayor concentración se acumulará en las branquias, en tanto que, si la ingesta predominante es por el alimento se acumulará en los tejidos u órganos principales del sistema digestivo (Borgman, 2000).

La exposición de ambas especies a las aguas de las tres desembocaduras, les generó daño genético. Este daño fue mayor en las aguas de la desembocadura del río Maipo tanto en *M. cephalus* como en *O. brevianalis*. Esto sugiere que las aguas de los tres cuerpos de agua, contienen agentes químicos en concentraciones biodisponibles que provocan algún grado de daño genético en peces. No obstante lo anterior, en el presente estudio la correlación del daño genético con los metales medidos en branquias en ambas especies fue baja. Esto puede ser debido a que los peces generan proteínas capaces de atrapar los metales disminuyendo su disponibilidad a nivel celular, estas proteínas corresponden a las metalotioneínas, que contienen un grupo tiol (-SH) el que facilita la unión al metal, participando en el proceso de desintoxicación (Babczynska *et al.*, 2011).

En los vertebrados y en particular en los peces, los procesos de desintoxicación dependen principalmente de la unión del metal a las metalotioneínas. La afinidad de la proteína es la siguiente Hg²⁺ > Cu⁺, Ag⁺, Bi³⁺, Cd²⁺ > Pb²⁺ > Zn²⁺ > Co²⁺ mostrando que el zinc es probable que sea desplazado por otros metales incluyendo aquellos que se consideran más tóxicos (Amiard *et al.*, 2006). Por otra parte, el efecto genotóxico pudiera ser por la generación

de especies reactivas de oxígeno (EROS) por exposición a metales (Pereira *et al.*, 2009). Otra posible explicación es que haya otros agentes químicos que no fueron medidos en este estudio y que podrían provocar el daño genético, particularmente en la desembocadura del río Maipo, tales como agroquímicos e hidrocarburos.

De acuerdo a los resultados obtenidos de genotoxicidad, se concluye en cuanto al nivel de daño, que la fauna íctica de las desembocaduras de los ríos Maipo y Aconcagua como el estero Catapilco están expuestas de manera significativa a la acción de agentes químicos genotóxicos. En el río Aconcagua el estado de daño con mayor porcentaje correspondió a ligeramente tóxico en ambas especies. En tanto que, en el río Maipo fue extremadamente tóxico. En el estero Catapilco fue moderadamente tóxico para *O. brevipalpi*. Finalmente, el daño genotóxico no se correlacionó con las concentraciones de los metales cobre, zinc y plomo medidos en branquias.

REFERENCIAS

- AIT ALLA, A., C. MOUNEYRAC, C. DUROU, A. MOUKRIM & J. PELLERIN. 2006. Tolerance and biomarkers as useful tools for assessing environmental quality in the Oued Souss estuary (Bay of Agadir, Morocco). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 143: 23-29.
- AMIARD, J. C., AMIARD-TRIUQUET, S. BARKA, J. PELLEGRIN & P. S. RAINBOW. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76: 160-202.
- ANDRADE, V. M., J. SILVA, F. R. SILVA, V.S. HEUSER, J. F. DIAS, M. L. YONEAMA & T. R. FREITAS. 2004. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the comet assay and micronucleus test. *Environmental Molecular Mutagen* 44 (5): 459-468.
- BANKS, K., P. TURNER, S. WOOD & C. MATTHEWS. 2005. Increased toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in mixtures of atrazine and diazinon at environmentally realistic concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 28-36.
- BABCZUNSKA, A., G. WILCZK, P. WILCZK, E. SZULINSKA & I. WITAS. 2011. Metallothioneins and energy budget indices in cadmium and copper exposed spiders *Agelena labyrinthica* in relation to their developmental stage, gender and origin. *Comparative Biochemistry and Physiology* 154:161-171.
- BORGMAN, U. 2000. Methods for assessing the toxicological significance of metals in aquatic ecosystems: bio-accumulation-toxicity relationships, water concentrations and sediments spiking approaches. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 3: 277-289.
- BRUGÉS, K & M. REGUERO-REZA. 2007. Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. Revista Colombiana de Biotecnología, 9 (1): 5-13
- CAKMAK, J. & H. MARSCHNER. 1988. Increase in membrane permeability and exudation in roots of zinc deficient plants. *Journal Plant Physiology* 132: 356-361.
- CANLI, M. & G. ATLI. 2003. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of the six Mediterranean fish species. *Environmental Pollution* 121 (1): 129-136.
- CARRIQUIRIBORDE, P. & A. E. RONCO. 2008. Distinctive accumulation patterns of Cd (II), Cu (II), y Cr (VI) in tissue of the South American teleost, pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Aquatic toxicology* 86: 313-322.
- COLLINS, A. R., A. G. MA & S. J. DUTHIE. 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. *Mutation Research* 336: 69-77.
- DE SCHAMPHELAERE, K. & C. JANSSEN. 2004. Effects of dissolved organic carbon concentration and source, pH, and water hardness on chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (5): 1115-1122.
- DÍAZ-JARAMILLO, M., J. L. FERREIRA, L. L. AMADO, J. VENTURA-LIMA, A. MARTINS, M. R. RETAMAL, R. URRUTIA C. BERTRAN, R. BARRA & J. M. MONSERRAT. 2010. Biomonitoring of antioxidant and oxidative stress response in *Perinereis gualpensis* (Polychaeta: Nereididae) in Chilean estuarine regions under different anthropogenic pressure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 515-523.
- EGITO, L. C., P. E. DOS SANTOS, V. S. DE MADEIROS & L. F. AGNES-LIMA. 2010. Use of native species *Crenicichla menezesi* (Ariidae) as a model for *in situ* evaluation of genotoxicity in surface water. *Science of the Total Environment* 408: 6042-6046.
- ERGENE, S., T. CAVAS, A. CELIK, N. KOLELII, F. KAYA & A. KARAHAN. 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.
- FAUST, A. M., R. AALTENBURGER, T. BACKHAUS, H. BLANK, W. BOEDEKER, P. GRAMATICA, V. HAMER, M. SCOLZECHOLZE, M. VIGHI & L. GRIMME. 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquatic Toxicology* 63: 43-63.
- FENECH, M., W. P. CHANG, M. KIRSCH-VOLDERS, N. HOLLAND, S. BONASSI & E. ZEIGER. 2003. Human project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 534: 65-75.
- FEVZI, Y., N. ZDEMIR, A. DEMIRAK & L. ATÚN. 2007. Heavy metal levels in two fishes species *Leuciscus cephalus* and *Lepomis gibbosus*. *Food Chemistry* 100: 830-835.
- GAETE, H, F. ARANGUIZ, G. CIENFUEGOS & M. TEJOS. 2007. Metales pesados y toxicidad de aguas del río Aconcagua en Chile. *Química Nova* 30: 885-891.
- GUEVARA G., S. OYARZÚN & J. MATURANA. 2006. Geoquímica de las Aguas del Río Elqui y de sus Tributarios en el Período 1975-1995: Factores Naturales y Efecto de las Explotaciones Mineras en sus Contenidos de Fe, Cu y As. *Agricultura Técnica* 66 (1): 57-69.

- INN (INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN). 1987. Instituto Nacional de Normalización: *Norma Chilena 1333, Of78*.
- JHA, A. N., Y. DOGRA, A. TURNER & G. E. MILLWARD. 2005. Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: Genotoxic effect and tissue-specific bioconcentration. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 586 (1): 47-57.
- KOUKOZIKA, N. & V. K. DIMITRIADIS. 2005. Multiple biomarker comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece coast: "lisosomal membrane stability, neutral red retention, micronucleus". *Ecotoxicology* 14: 449-463.
- LAZO, P., M. CURÉ & H. GAETE. 2006. Modeling of the sulfur dioxide dispersion in the Puchuncavi city using the program ISC3. *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 14 (3): 229-237.
- LIMAN, R., I.G. HAKKI, D. AKYIL, Y. EREN & M. KONUK. 2011. Determination of genotoxicity of fenaninosulf by Allium and comet tests. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99: 61-64.
- LOZADA-ZÁRATE, J. E., W. SCOTT-MONKS, G. PULIDO-FLORES, A. GORDILLO-MARTÍNEZ & F. PRIETO-GARCÍA. 2007. Determinación de metales pesados en *Cyprinus Carpio* de la laguna de Metztilán, Hidalgo, México. In: Pulido-Flores, G. & A. L. López- Escamilla (Eds.). *IV Foro de Investigadores por la Conservación y II Simposio de Áreas Naturales Protegidas del Estado de Hidalgo*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 91-94 p.
- MOHANTY, G., J. MOHANTY, A. NAYAK, S. MOHANTY & S. DUTTA. 2011. Application of comet assay in the study of DNA damage and recovery in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings after an exposure to phorate, an organophosphate pesticide. *Ecotoxicology* 20: 283-292.
- MOP (MINISTERIO DE OBRAS PÚBLICAS DE CHILE). 2004a. *Diagnóstico y clasificación de los cursos y cuerpos de agua según objetivos de calidad: cuenca del Río Maipo*. Dirección General de Agua, 195 p.
- MOP (MINISTERIO DE OBRAS PÚBLICAS DE CHILE). 2004b. *Diagnóstico y clasificación de los cursos y cuerpos de agua según objetivos de calidad: cuenca del río Aconcagua*. Dirección General de Agua, 154 p.
- MORENO, M. D. 2003. *Toxicología ambiental. Evaluación del riesgo para la salud humana*. Ed. McGraw-Hill, Madrid, 384 p.
- ORIEUX, N., S. CAMBIER, P. GONZÁLEZ, B. MORIN, CH. ADAM, G. J. LAPLACE & J. P. BOURDINEAUD, J. P. 2011. Genotoxic damages in zebra fish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lost River. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74 (4): 974-83.
- PAPIS, E., J. D. SIMON & N. J. AWADHESH. 2011. Relative sensitivity of fish and mammalian cells to the antibiotic, trimethoprim: cytotoxic and genotoxic responses as determined by neutral red retention, Comet and micronucleus assays. *Ecotoxicology* 20: 208-217.
- PEREIRA, P., H. DE PABLO, C. VALE & M. PACHECO. 2009. Combined use of environmental data and biomarkers in fish (*Liza aurata*) inhabiting a eutrophic and metal-contaminated coastal system- Gills reflect environmental contamination. *Marine Environmental Research* 69: 53-62.
- PIZARRO, J., P. M. VERGARA, J. A. RODRÍGUEZ & A. M. VALENZUELA. 2010. Heavy metals in northern Chilean rivers: Spatial variation and temporal trends. *Journal of Hazardous Materials* 181: 747-754
- RAJAGURU, P., S. SUBA, M. PALANIVEL & K. KALAISELVI. 2003. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and Earthworm tissues. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 41: 85-91.
- REN, S., R. MEE & P. FRYMIER. 2004. Using factorial experiments to study the toxicity of metal mixtures. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 38-43.
- RICHTERA, P., R. SEGUEL & I. AHUMADA. 2004. Arsenic speciation in environmental samples of a mining impacted sector of central Chile. *Journal of the Chilean Chemical Society* [online] 49 (4): 333-339.
- ROMEDA, A., Y. SIAUB, Z. SIDOUMOU & M. GNASSIA-BARELLI. 1999. Heavy metal distribution in different fish species from the Mauritania coast. *Science of the Total Environment* 232: 169-175.
- SCHMID, W. 1975. The micronucleus test. *Mutation research* 31:9-15.
- SINGH, N. P., M. T. MCCOY, R. R. TICE & E. L. SCHNEIDER. 1988. A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175: 184-191.
- SIMONIELLO M. F., F. GIGENA, G. POLETTA, A. LOTESTE, E. KLEINSORGE, M. CAMPANA, J. SCAGNETTI & M. J. PARMA. 2009. Alkaline Comet assay for genotoxic effect detection in Neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology* 83: 155-158.
- SRIVASTAVA, S. S., R. D. MISHRA, S. TRIPATHI, D. DWIVEDI & K. GUPTA. 2006. Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatin in *Hydrilla certicillata* (L. F.). *Royle Aquatic Toxicology* 80: 405- 415.
- TAPIA, J., C. BERTRÁN, C. ARAYA, M. J. ASTUDILLO, L. VARGAS-CHACOFF, H. CARRASCO, A. VALDERRAMA & L. LETELIER. 2009. Study of the copper, chromium and lead content in *Mugil cephalus* and *Eleginops maclovinus* obtained in the mouths of the Maule and Mataquito Rivers (Maule Region, Chile). *Journal of the Chilean Chemical Society* 54 (1): 36-39.
- YILMAZ, F., N. ÖZDEMİR, A. DEMIRAK & A. TUNA. 2007. Heavy metal levels in two fish species *Leuciscus cephalus* and *Lepomis gibbosus*. *Food Chemistry* 100: 830- 835.
- ZHANG, L. J., J. F. JIA, J. G. HAO, J. R. CEN & LI T. K. 2011. A modified protocol for the comet assay allowing the processing of multiple samples. *Mutation Research* 721: 153-156.

Recibido: 7 de diciembre del 2012.

Aceptado: 8 de abril del 2014.