

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas



Efecto de la actividad antrópica sobre parámetros metabólicos e histológicos en el mejillón *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia) del Golfo San Matías (Río Negro).

Autora: Leis Magalí

Tesis presentada para optar al título de Licenciada en Ciencias Biológicas

Director de Tesis: Dr. Sebastián Eduardo Sabatini

Codirectora: Dra. Griselda Genovese

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Enzimología, Estrés y Metabolismo. Departamento de Química Biológica, IQUBICEN-CONICET, FCEN-UBA. Laboratorio de Ecotoxicología Acuática, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, IBBEA-CONICET, FCEN-UBA.

Diciembre, 2019

RESUMEN

Una de las principales problemáticas a tratar con respecto a la contaminación marina es la alta concentración de metales traza en las zonas costeras debido al aumento de los desechos antropogénicos. Los metales pueden bioacumularse por las especies circundantes y afectan muchas veces su salud como también la del ser humano. En este trabajo se midieron parámetros fisicoquímicos en el agua y biomarcadores para evaluar los factores antrópicos y sus efectos en relación con la acumulación de metales en el golfo San Matías de la Provincia de Río Negro. Se estudiaron dos sitios, uno con alto impacto antrópico: Puerto del Este (PE) y otro sitio de referencia, la Isla Mejillón (IM) durante los meses de julio de 2016 y marzo de 2017. Se escogió *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia) como especie bioindicadora por ser un organismo filtrador, sésil y cosmopolita, ampliamente utilizado en estudios de biomonitorio ambiental. Se midieron las concentraciones de cobre, cromo, níquel y zinc en el agua de mar y las acumuladas en branquia, glándula digestiva y manto. Además, se analizaron como biomarcadores parámetros de estrés oxidativo y alteraciones histopatológicas, incluyéndose un estudio morfométrico de la altura del epitelio en distintas zonas del filamento branquial.

Los metales medidos en el agua como en los distintos órganos en general registraron mayores concentraciones en el puerto. Específicamente, las concentraciones de cromo, níquel y zinc del agua fueron mayores en PE en comparación a las de IM. Con excepción del manto, los valores de níquel y zinc permanecieron invariables en los órganos. Las branquias de mejillones colectados en PE acumularon cobre y cromo. El glutatión reducido (GSH) en branquias fue menor en verano independientemente del sitio, y no hubo variación de la enzima glutatión-s-transferasa (GST). Sólo se encontró daño a lípidos en invierno/PE. Se observó acumulación de hemocitos y dilatación de los vasos hemolinfáticos en los filamentos de las branquias de mejillones del puerto, típico de animales expuestos a contaminantes o que sufren procesos infecciosos. También se verificó un incremento en la altura del epitelio de la zona sublateral

branquial, encargada del intercambio gaseoso, por lo que se presume que la difusión de gases se verá afectada. El epitelio de la zona abfrontal, que normalmente presenta mucocitos, mostró un adelgazamiento pronunciado, probablemente por la expulsión de metales con el mucus. La glándula digestiva de animales colectados en PE acumuló cobre y cromo. Se registró una reducción marcada de GSH, un aumento de la peroxidación lipídica, numerosos gránulos de lipofuscina en células absorptivas y un aumento de células basófilas, demostrando un incremento en la detoxificación de este órgano. El manto de los mejillones del sitio PE acumularon cobre y zinc, se registró alta actividad de GST y daño oxidativo a lípidos.

Los resultados surgidos en este trabajo de tesis aportan evidencias de la existencia de metales en el agua de Puerto del Este y su bioacumulación en órganos de *M. edulis* que probablemente, sean responsables de alteraciones histológicas en branquias y glándula digestiva. El efecto pro-oxidante causado por los metales dependió de la capacidad antioxidante del órgano en cuestión, mostrando daños en los órganos estudiados.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a Sebastián y a Griselda mis directores, por ser excelentes guías, docentes y científicos. Por permitirme realizar esta tesis y darme el ánimo y ayuda necesaria para poder terminarla, más allá de todos los inconvenientes personales que pudieron haber surgido en estos años.

A Fabiana por ser una gran tutora y directora de laboratorio, por acompañarme durante todo el ciclo superior y por presentarme a mis directores.

A toda la gente del laboratorio de Ecotoxicología Acuática que con cariño siempre me ayudó y me brindó el espacio para participar y sacarme dudas.

A Tatiana del laboratorio de Enzimología, Estrés y Metabolismo por ayudarme con las técnicas de laboratorio y brindarme su buena onda.

A Sara Maldonado del laboratorio de Biología del Desarrollo de las Plantas, que ya no está entre nosotros y que muy amablemente nos permitió usar el microscopio Zeiss de su laboratorio.

A mi pareja Jerónimo que me alentó a finalizar la tesis, me acompañó y ayudó mucho durante el proceso.

A todos mis amigos, los de la facultad, el profesorado y el colegio en el que trabajo y principalmente a mis tres mejores amigos Martín, Anabel y Facundo, que me apoyaron sentimentalmente muchísimo y me ayudaron con las ideas y correcciones.

Y a mi familia y principalmente a mi madre Raquel por su amor, su apoyo y sus valores de siempre.

A todos ellos, muchísimas gracias.

ÍNDICE

1. Introducción	8
1.1. Contaminación marina	8
1.1.1. Efectos de los metales sobre la biota	9
1.2. Especies bioindicadoras	10
1.2.1. <i>Mytilus edulis</i>	11
1.2.2. Morfología y función de las branquias de <i>M. edulis</i>	12
1.2.3. Glándula digestiva de <i>M. edulis</i>	16
1.3. Biomarcadores de contaminación	16
1.3.1. Parámetros de estrés oxidativo	17
1.3.2. Alteraciones histopatológicas	20
Objetivos	22
Objetivos particulares e hipótesis	22
2. Materiales y métodos	23
2.1. Sitios de muestreo	23
2.2. Procesamiento de muestras	25
2.3. Parámetros a determinar	26
2.3.1. Determinación de proteínas totales	26
2.3.2. Antioxidantes enzimáticos: Actividad GST	26
2.3.3. Antioxidantes no enzimáticos: Glutación reducido	27
2.3.4. Evaluación de daño a lípidos. Determinación de TBARS	27
2.4. Cuantificación de las concentraciones de metales	28

2.4.1. Digestión ácida	28
2.4.2. Análisis de Espectroscopia de Emisión Óptica con Plasma Acoplado Inductivamente	29
2.5. Observaciones histológicas y morfometría	29
2.5.1. Técnicas histológicas	30
2.5.2. Observaciones histopatológicas	31
2.5.3. Morfometría	32
2.6. Análisis estadístico	33
3. Resultados	34
3.1. Características morfométricas de <i>M. edulis</i> , profundidad de extracción y temperatura media de los sitios de muestreo	34
3.2. Contenido de metal	35
3.2.1. Concentración de metales en el agua	35
3.2.2. Concentración de metales en órganos de <i>M. edulis</i>	35
3.3. Contenido de proteínas en distintos órganos de <i>M. edulis</i>	36
3.4. Defensas antioxidantes en distintos órganos de <i>M. edulis</i>	38
3.4.1. Actividad GST	38
3.4.2. Contenido de GSH	38
3.5. Peroxidación lipídica en distintos órganos de <i>M. edulis</i>	41
3.6. Observaciones histológicas y morfometría	43
3.6.1. Observaciones histopatológicas	43
3.6.2. Análisis morfométrico	55
4.1.1. Concentración de metales en el agua	58
4.1.2. Concentración de metales en <i>M. edulis</i>	60

4.2. Balance oxidativo en <i>M. edulis</i>	62
4.2.1. Defensas antioxidantes	62
4.2.2. Daño oxidativo	66
4.3. Alteraciones histológicas en <i>M. edulis</i>	66
4.4. Análisis morfométrico	69
5. Conclusiones Generales	73
6. Referencias Bibliográficas	74

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación marina

El artículo primero de la Convención de las Naciones Unidas sobre el Derecho del Mar define a la contaminación del medio marino como “la introducción por el hombre, directa o indirectamente, de sustancias o de energía en el medio marino incluidos los estuarios, que produzca o pueda producir efectos nocivos tales como daños a los recursos vivos y a la vida marina, peligros para la salud humana, obstaculización de las actividades marítimas, incluidos la pesca y otros usos legítimos del mar, deterioro de la calidad del agua del mar para su utilización y menoscabo de los lugares de esparcimiento” (United Nations Convention on the Law of the Sea, 1982).

La contaminación del medio acuático constituye un problema creciente a nivel mundial debido al aumento de los desechos antropogénicos y al impacto que estos provocan en los organismos y en los ecosistemas (United Nations Environment Programme. Annual Report 2010, 2011; Phillips, 1995; Kachel, 2008). En este sentido, es importante poder analizar los factores involucrados en la contaminación, para luego poder tomar medidas argumentadas al respecto. Se conoce además que uno de los mayores contaminantes que se pueden evaluar y relevar son las concentraciones de metales en las zonas costeras (Islam y Tanaka, 2004). En nuestro país, la Secretaría de Recursos Naturales y Ambiente Humano estableció los niveles guía de calidad del agua salada para la protección de la vida acuática bajo el Decreto 831/93 que reglamenta la ley de residuos peligrosos (Ley N° 24.051 Tabla 3, Anexo II).

Todos los metales, ya sean biológicamente esenciales o no, se caracterizan por ser potencialmente dañinos en los organismos a concentraciones elevadas. Sus efectos negativos radican en su baja biotransformación o descomposición y su alta toxicidad, la potencial bioacumulación y la biomagnificación a través de las redes tróficas (Miller *et al.*, 2002; Censi *et al.*, 2006). Estos dos últimos procesos son específicos para cada metal y taxón. El ingreso y acumulación de los metales en los organismos dependerá de factores bióticos y abióticos que los hacen

biodisponibles, como así también de las vías de asimilación, almacenamiento y los mecanismos de excreción de los organismos (Luoma *et al.*, 1992; Sabatini *et al.*, 2011). La cuantificación de metales en los organismos acuáticos surgió como campo de investigación para determinar correctamente los niveles de contaminación y poder evaluar los impactos ambientales (Salvador *et al.*, 2004).

1.1.1 Efectos de los metales sobre la biota

La mayoría de los átomos de la primera fila de los metales de transición del bloque “d” contienen electrones desapareados en los átomos o en los iones que forman estos átomos y por esto pueden ser considerados en sí mismos radicales libres. El potencial de reducción de estos metales y su estado de oxidación depende del ligando del metal, de la enzima y la reacción que está catalizando. El peligro de estos metales de transición en el metabolismo celular radica en que por más que su disponibilidad para las reacciones esté controlada, igualmente pueden participar en reacciones radicalarias no deseadas como auto-oxidaciones y formación de radicales hidroxilos (Halliwell y Gutteridge, 2015).

Los mecanismos por los cuales los metales ejercen su toxicidad en los organismos vivos son muy variados e incluyen principalmente uniones a proteínas no blanco, lo que puede impedir que cumplan sus funciones metabólicas normales y se produzcan desbalances oxidativos (Rainbow, 1990). Se conoce que existe una correlación entre los metales, principalmente los de transición, y el aumento del estrés oxidativo por ser catalizadores para la producción de radicales libres través de la reacción de Fenton (Figura 1) (Halliwell, 2000). El aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs) produce daño oxidativo a macromoléculas esenciales tales como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, lo que conlleva finalmente al daño de las diferentes organelas.

Por más de 20 años, en la mina llamada “Gonzalito” de la bahía de San Antonio en el Golfo San Matías (Rio Negro), se explotaron metales como plomo, cobre y zinc (Vázquez *et al.*, 2007). A mediados de los años 90 se realizó una evaluación de metales en sedimentos de esta zona, detectando valores de cadmio, cobre, plomo

y zinc, superiores a los registrados en otras localidades de la costa patagónica (Commendatore *et al.*, 1996). En el mismo estudio se comprobó que los mejillones provenientes de la bahía de San Antonio acumularon concentraciones de zinc, cobre y cadmio, potencialmente riesgosas para la salud humana.

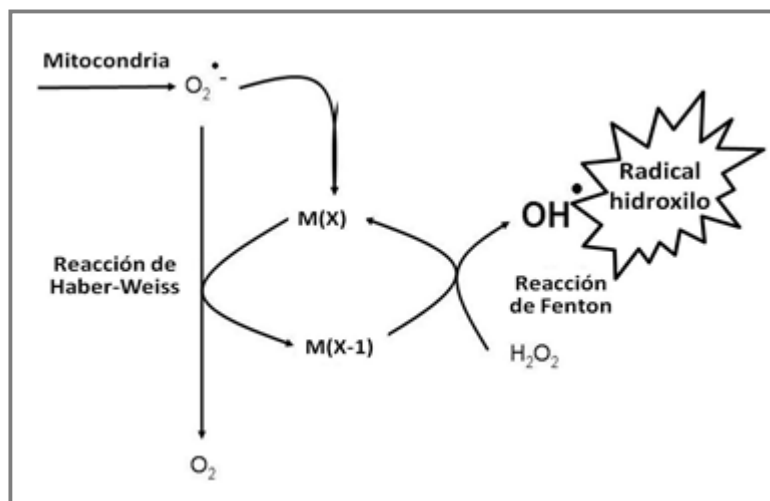


Figura 1. Reacción de Haber-Weiss, que incluye la reacción de Fenton (modificado de Kell, 2009). Los metales (M) pueden actuar como catalizadores en la reacción de Fenton, facilitando la conversión del anión superóxido a oxígeno y de peróxido de hidrógeno a radical hidroxilo (Stohs y Bagchi, 1995).

Por su parte, Esteves y Commendatore (1993) reportaron niveles de metales extraordinariamente altos, incluido el plomo, en sedimentos cercanos al puerto de San Antonio, relacionados con una antigua planta productora de cloruros alcalinos. Sin embargo, hasta el presente, no se reportaron efectos perjudiciales de estos metales sobre bivalvos de esa región.

1.2. Especies bioindicadoras

Debido a su amplia distribución, por ser organismos sedentarios filtradores y por su capacidad para acumular compuestos orgánicos y tóxicos, los mejillones han sido ampliamente utilizados como organismos centinela para monitorear los niveles de contaminantes en el entorno costero (Charmasson *et al.*, 1999;

Kimbrough *et al.* 2008). En la Argentina, los bancos de bivalvos marinos son abundantes a lo largo de toda la costa, tanto en el ambiente intermareal como en el submareal, desde la Provincia de Buenos Aires hasta el extremo sur de Tierra del Fuego.

Por su parte, los bivalvos constituyen una fuente de proteína animal saludable, con altos niveles de ácidos grasos esenciales, lo que ha motivado un aumento en el consumo de estos productos, permitiendo proyectar una significativa expansión de este sector de la acuicultura. En particular, las pesquerías de bivalvos en el Golfo San Matías representan un importante recurso socio-económico de la Provincia de Río Negro, con desembarques anuales de más de 1500 toneladas, siendo *Mytilus edulis* una de las especies de mayor importancia comercial (Millán, 2003; Narvarte *et al.*, 2007). Debido a esta causa es importante monitorear las concentraciones de metales traza en estos moluscos no solo por cuestiones ambientales sino también por cuestiones de salud pública (Sunila, 1987).

1.2.1. *Mytilus edulis*

El mejillón *Mytilus edulis* es un molusco bivalvo marino perteneciente a la familia Mytilidae. Corresponde más específicamente a un grupo reconocido como *Mytilus* “de valvas blandas” con distribución cosmopolita (Astorga *et al.*, 2015). La taxonomía de este género es bastante compleja (Svärdh 2003a), habiendo poco consenso de clasificación entre especies emparentadas de *Mytilus*: *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*, descritas inicialmente por Linneo (1758), Lamarck (1819) y Gould (1852), respectivamente. Las dos primeras especies viven en zonas templadas y frías mientras que la última vive en zonas boreales (Borsa *et al.*, 2011). Algunas investigaciones afirman que existen poblaciones de *M. edulis* suficientemente emparentadas genéticamente como para ser consideradas la misma especie, sin embargo, en otras investigaciones son nombradas como subespecies (*M. edulis chilensis* y *M. edulis platensis*) (Borsa *et al.*, 2011; Astorga *et al.*, 2015; Sar *et al.*, 2018). Según Astorga *et al.* (2015) las poblaciones que se distribuyen en América del Sur (Brasil, Argentina, Uruguay y Chile), han sido agrupadas en el

complejo de especies denominado "*Mytilus edulis*", debido a la falta de claridad en la identificación morfológica por continuar en proceso de especiación.

Los adultos de *M. edulis* son organismos gregarios que suelen vivir en grandes bancos adheridos a rocas o sustratos duros. En las costas del sur argentino ocupan la zona intermareal desde los 7 m hasta aproximadamente unos 35 m de profundidad en sustratos rocosos y hasta los 20 m en sustratos fangosos (Sar *et al.*, 2018). Las densidades de mejillones que se asientan en las rocas dependen de varios factores como las formas y el tipo de rocas o sustratos. Por un lado, cuanto más rugoso o socavado está el sustrato estos animales parecen adherirse más fácilmente, y lo contrario sucede en superficies muy lisas o demasiado empinadas. El asentamiento también depende de las condiciones y topografía de las costas y por lo tanto del oleaje que impacta sobre ellas (Seed, 1969).

En cuanto a la anatomía externa de *M. edulis* se observan dos valvas, compuestas por carbonato de calcio y proteínas secretadas por el manto, que recubren al animal (Figura 2A). El manto está adherido débilmente a las valvas por su tejido epitelial y más fuertemente por la fijación al músculo abductor. Poseen un pie pequeño y se adhieren al sustrato mediante los filamentos del biso (Svärdh, 2003a). Son organismos gonocóricos y las gónadas están alojadas en el manto. En la etapa reproductiva se puede distinguir el sexo del animal observando el color del manto, anaranjado o rojizo para las hembras, pálido y blancuzco para los machos (Svärdh, 2003a; Sar *et al.*, 2018). La etapa reproductiva suele durar varios meses dependiendo de la latitud en la que se encuentran y las condiciones climáticas de la zona; las poblaciones se sincronizan para el desove (Sar *et al.*, 2018).

1.2.2. Morfología y función de las branquias de *M. edulis*

Las branquias se ubican en la cavidad del manto o paleal y son del tipo filibranquia homorrabdítica. Son órganos multifuncionales en donde ocurre, entre otras funciones, el intercambio gaseoso con el agua y la selección de partículas alimenticias con posterior transporte hacia la boca. Por el permanente contacto con

el agua, este órgano constituye la primera barrera de exposición a contaminantes y patógenos (Rivera-Ingraham *et al.*, 2016).

En corte transversal cada holobranquia tiene forma de “w” y está formada por una hemibranchia interna y una externa; a su vez cada hemibranchia (o bien demibranchia) posee una laminilla descendente y una ascendente (Figura 2B).

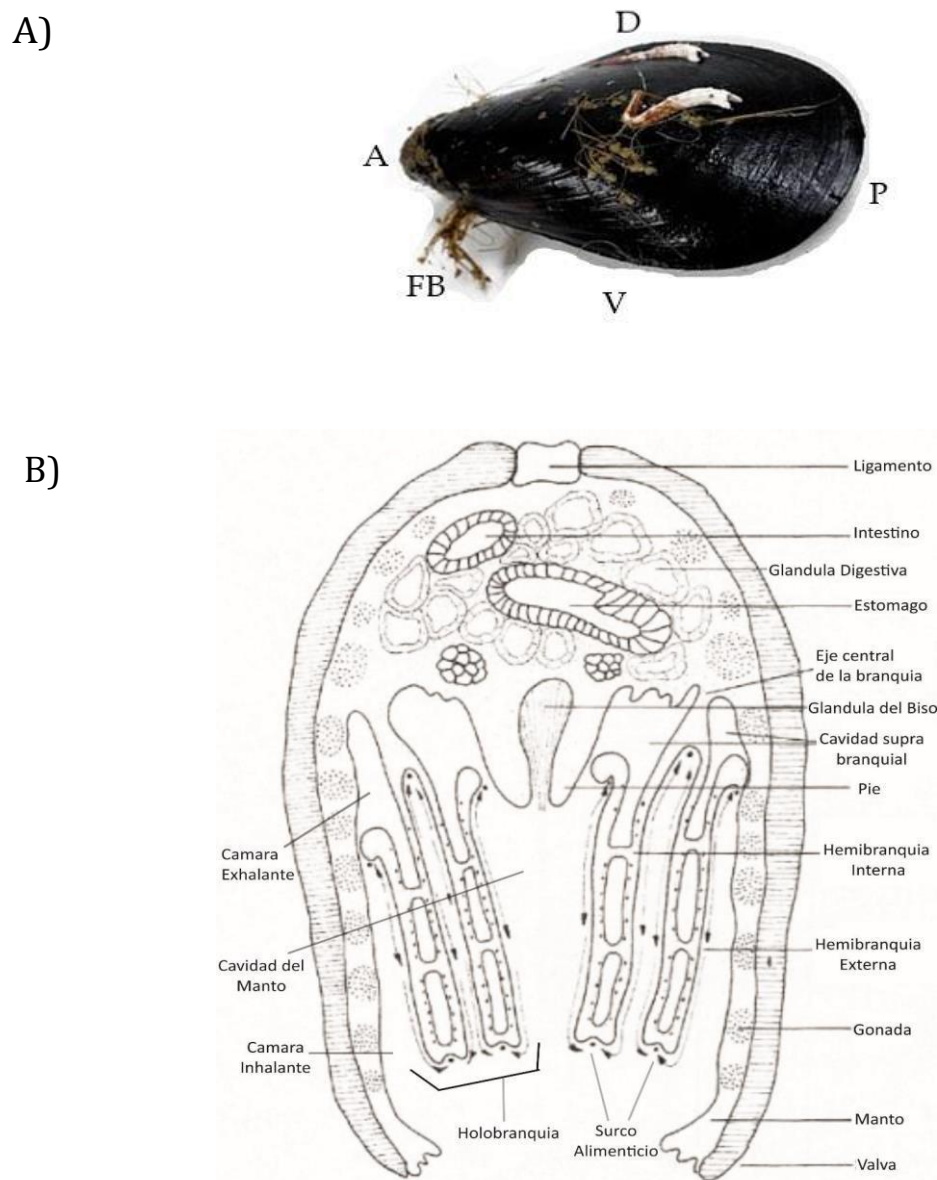


Figura 2: *M. edulis* en vista lateral izquierda (A) y esquema en corte transversal (B) (modificado de Svärth, 2003a). Se indican las partes del organismo incluyendo el manto, las valvas, las branquias y el sistema digestivo. A: anterior, P: posterior, D: dorsal, V: ventral, FB: filamento del biso. La circulación del agua se indica con flechas pequeñas.

Cada laminilla está constituida por filamentos paralelos similares (Figura 3). Los filamentos poseen distintos tipos de cilias que permiten la unión a filamentos vecinos, generan la fuerza de bombeo del agua que ingresó a la cavidad paleal y funcionan como filtros selectivo de partículas (Owen, 1974; Dufour y Beninger 2001). Cada filamento es similar a un tubo aplanado expuesto al agua de mar inhalada (Wright *et al*, 1987). Los filamentos están revestidos externamente por un epitelio simple que representa la mayor parte de la masa de la branquia, e internamente existe un vaso hemolinfático rodeado de endotelio.

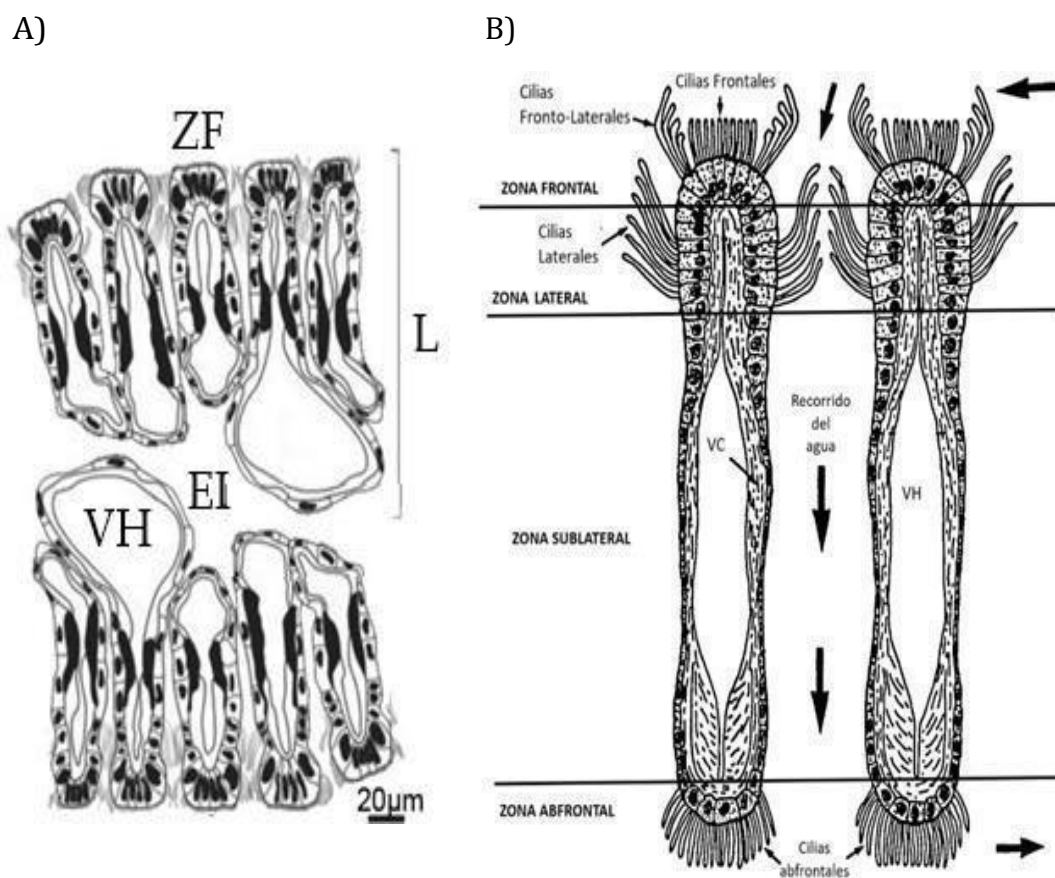


Figura 3: Esquemas de corte transversal de branquia de *M. edulis* modificada de Nogarol *et al.* (2012) y de Wright *et al.* (1987). A) se detalla una hemibranchia formada por la laminilla descendente y la ascendente con numerosos filamentos branquiales. B) se muestran dos filamentos con cuatro zonas morfo-funcionales distintas. Las flechas negras indican el recorrido del agua. EI: espacio interlaminillar, L: laminilla, VH: vaso hemolinfático. VC: varilla de conquiolina, ZF: zona frontal.

El sostén de los filamentos es una varilla de conquiolina similar al colágeno (Figura 3). En cada filamento se pueden distinguir cuatro zonas morfofuncionalmente diferentes: las diferencias principales se basan en el grosor del epitelio, la presencia y tipo de mucocitos y el tipo de cilias (Figura 3) (Owen, 1974; Wright *et al.*, 1987). La **zona frontal** está compuesta por tres tipos distintos de células: (1) las células ciliadas, que se diferencian a su vez según los formatos y tamaños de cilias, (2) los mucocitos (o células caliciformes) y (3) las células epiteliales columnares. Existen dos tipos diferentes de células ciliadas en esta región frontal, las cilias frontales son cortas y movilizan las partículas por la superficie branquial hacia el surco branquial ventral, para que luego sean transportadas hacia los palpos y la boca del mejillón (Beninger y Jean, 1997; Svårdh, 2003a). Las células ciliadas fronto-laterales poseen cilias en degradé (o en escalera) que forman una malla o red que atrapa (filtra) las partículas del agua que pasa entre los filamentos; dichas partículas son transportadas hacia las cilias frontales. La **zona lateral** posee células con cilias largas que generan el bombeo del agua que permite la filtración y además forman uniones interfilamentales para mantener la estabilidad estructural de la branquia (Owen, 1974). En la **zona sublateral** las células epiteliales se aplanan. Aquí no hay células ciliadas y sólo hay mucocitos en el límite con la zona lateral. Es notorio el plegamiento apical en forma de microvellosidades, observado con microscopia electrónica, que aumenta la superficie de intercambio gaseoso en esta región (Wright *et al.*, 1987).

La **zona abfrontal** posee cilias cortas, numerosos mucocitos y células columnares (Dufour y Beninger 2001; Wright *et al.*, 1987). Se cree que esta zona participa en la limpieza de la branquia (función original en protobranquios) y en la eliminación de partículas pequeñas o patógenos. Está en discusión si colabora además en el bombeo del agua ya que las cilias son muy cortas (Jones *et al.*, 1990; Dufour y Beninger, 2001).

Los mucocitos son glándulas exócrinas unicelulares que se diferencian por el tipo de secreción que producen, lo cual está relacionado con la alimentación y la limpieza. Hay mucocitos con mucopolisacáridos ácidos, otros con mucopolisacáridos del tipo neutro y mucocitos con secreción mixta (Beninger *et al.*,

1993, 1997). En estos trabajos se caracterizan los mucocitos en distintas partes de la branquia y del manto de *M. edulis*.

1.2.3 Glándula digestiva en *M. edulis*

La glándula digestiva es donde ocurre la digestión intracelular en bivalvos, además es el órgano detoxificador con alta actividad metabólica y un sitio de defensa (Marigomez *et al.*, 2002; Dimitriadis *et al.*, 2004). La glándula digestiva está constituida por túbulos ciegos formados por un epitelio columnar simple con células digestivas y células basófilas. Los lisosomas de las primeras constituyen el sitio blanco de varios contaminantes (Cajaraville *et al.*, 1993; Moore, 1990). Dentro de los lisosomas se acumulan unos gránulos insolubles formados por lipofuscinas, que son producto del proceso de peroxidación de lípidos y lipoproteínas (Terman y Brunk, 2004; Viarengo *et al.*, 2007); la cantidad de gránulos acumulada indica el nivel de daño celular (Viarengo y Nott, 1993) siendo muy útil en programas de biomonitoreo (Mathew y Damodaran 1997; Krishnakumar *et al.*, 1994; Aarab *et al.*, 2011) y en estimaciones de edad de bivalvos con líneas de crecimiento poco definidas (Lomovasky *et al.*, 2002). Este bioindicador puede depender de la temperatura y los cambios en el ciclo reproductivo (Bocchetti y Regoli, 2006; Petrović *et al.*, 2004; Regoli, 1992).

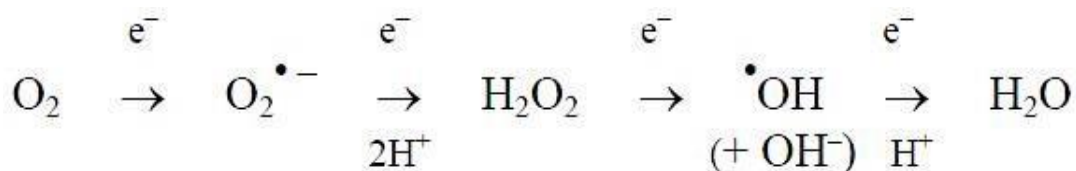
1.3 Biomarcadores de contaminación

Contrariamente al monitoreo químico de los organismos, en el que principalmente se evalúa la presencia de contaminantes en los órganos por medio de análisis químicos, los métodos de biomonitoreo evalúan no solo la presencia, sino también la respuesta de los organismos a contaminantes por medio del estudio de biomarcadores, los cuales son parámetros que reflejan el efecto a distintos niveles de organización: molecular, celular, de órganos y organismos. El uso de biomarcadores en el monitoreo no reemplaza el monitoreo químico, sino que lo complementa al determinar los efectos tóxicos de los contaminantes, incluso cuando estos se encuentran en concentraciones bajas y subletales (Boelsterli, 2003;

Lam y Gray, 2003). Las determinaciones de parámetros de estrés oxidativo se han propuesto como biomarcadores de contaminación ambiental (Van der Oost *et al.*, 2003) y son comúnmente utilizadas, junto a otros bioindicadores. Por otro lado, la histopatología evidencia lesiones tisulares inducidas por contaminación ambiental y/o enfermedades. Es un método factible que permite analizar alteraciones en diversos órganos en individuos obtenidos del campo (Hinton y Laurèn, 1990).

1.3.1 Parámetros de estrés oxidativo

En todas las células aeróbicas, durante el proceso de respiración celular, el oxígeno molecular se reduce formando agua y normalmente durante ese proceso se producen intermediarios reactivos que derivan del oxígeno, que colectivamente se nombran como “especies reactivas del oxígeno” (EROs) (Ecuación 1). Estas especies producen la oxidación de muchas otras moléculas y componentes celulares, lo cual puede provocar daños de diferentes magnitudes en la misma (Alberts *et al.*, 1994; Halliwell, 2000; Rivera-Ingraham *et al.*, 2016).



Ecuación 1: adaptada de Di Salvatore *et al.* (2013) donde se muestra la reducción del oxígeno (O₂) a agua (H₂O). Esta cuenta con cuatro etapas de transferencia de electrones, en las que se producen diversos productos intermedios de oxígeno (O₂^{•-}: anión superóxido; H₂O₂: peróxido de hidrógeno; ·OH radical hidroxilo).

Algunas de las EROs que se derivan son los radicales libres del oxígeno, iones del oxígeno y peróxidos, más específicamente: el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el anión radical superóxido (O₂^{•-}), el radical hidroxilo (OH[•]), el radical hidronio (HO₂[•]), el óxido de nitrógeno (NO[•]), entre otros (Lesser, 2006). En recientes investigaciones con bivalvos, entre ellos *M. edulis*, se han medido EROs (Rivera-

Ingraham *et al.*, 2016). Se pueden formar radicales libres con electrones desapareados, así como también especies no radicalarias muy reactivas como el peróxido de hidrógeno (San Miguel y Martin Gil, 2009).

Estas EROs, por un lado al ser muy reactivas e intermediarias de los procesos celulares, suelen tener tiempos cortos de vida media en la célula y se encuentran normalmente compartimentalizadas en lugares específicos, como ser en la mitocondria, en el retículo endoplasmático o en los lisosomas (Lesser, 2006) cumpliendo funciones puntuales entre las cuales se encuentra la señalización mediante varios mecanismos (Rivera-Ingraham *et al.*, 2016), ayuda al plegamiento proteico y como defensa celular (y específicamente del sistema inmune) ante diferentes patógenos, moléculas o partículas extrañas (Halliwell, 2000). Cuando las condiciones del medio o del interior de la célula son des-reguladas o alteradas estas especies aumentan en cantidad dentro de la célula, lo cual puede generar daños celulares o subcelulares y eventualmente llevar a la célula hacia la apoptosis o unanecrosis (Halliwell, 2000; Lesser, 2006).

La principal fuente de EROs en la célula es el metabolismo de los hidratos de carbono y los lípidos para obtener energía (Alberts *et al.*, 1994) pero no hay que olvidar que este tipo de especies también se producen en muchos otros tipos de reacciones y procesos fisiológicos a nivel celular y que los organismos están expuestos a una batería de fuentes extrínsecas de EROs que pueden afectar el metabolismo (Winterbourne, 2008). Se conoce que existe una correlación entre los metales traza, principalmente los de transición y el aumento del estrés oxidativo por ser catalizadores para la producción de radicales libres (Halliwell, 2000).

Las consecuencias de las reacciones de los radicales libres con diferentes componentes celulares pueden ser muy variadas. Los objetivos celulares frecuentemente atacados son el ADN, los lípidos de membrana, así como proteínas y carbohidratos. El daño oxidativo a los lípidos se produce principalmente en membranas lipídicas modificando la permeabilidad y fluidez de las membranas. A partir de estas degradaciones se producen varias moléculas con grupos

aldehídos o hidrocarburos (Lesser, 2006). El daño puede medirse y cuantificarse en las membranas mediante la prueba de ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Halliwell y Gutteridge, 2015).

Con respecto a las proteínas, el daño oxidativo se observa como modificaciones químicas de aminoácidos particulares, ruptura de la cadena aminoacídica, formación de enlaces covalentes nuevos, formaciones de productos de reacciones cruzadas y alteraciones de la carga eléctrica, lo cual lleva a las proteínas a ser más fáciles de degradar o que no cumplan la función adecuada. No todas las proteínas ni los aminoácidos de las mismas son igual de susceptibles a la degradación porque todo depende del tipo de aminoácido, de la estructura de la proteína y que aminoácidos deja expuestos y del tipo de EROs involucrado en el daño oxidativo (Fagan *et al.*, 1999).

El ADN en cambio puede ser dañado por EROs causándole mutaciones, deleciones y otras lesiones que pueden ser letales para la célula. Tanto el azúcar como la base nitrogenada pueden ser atacadas causando por ejemplo rupturas de enlaces, oxidaciones de varios tipos y uniéndolas covalentemente a proteínas. Las células cuentan con muchísimos mecanismos proteicos para la reparación del ADN, por lo cual este tipo de lesiones son menos comunes que las de lípidos o proteínas (Sánchez, 2005).

Siendo que la generación endógena de EROs ocurre naturalmente en todos los organismos aeróbicos, éstos presentan defensas ante las especies reactivas, las cuales pueden diferenciarse en defensas enzimáticas y no enzimáticas (San Miguel y Martin Gil, 2009). Los antioxidantes pueden prevenir o retardar la oxidación de un sustrato biológico y en algunos casos revertir el daño oxidativo de las moléculas afectadas. Al fin y al cabo el tipo y la cantidad de daño celular depende de la homeostasis que existe entre EROs producidos por los distintos factores y las defensas de las células ante estos daños oxidativos (Halliwell, 2000).

- Defensas enzimáticas

El descubrimiento de defensas enzimáticas comenzó con el hallazgo de la enzima superóxido dismutasa en 1969 (McCord y Fridovich, 1969) la cual dismuta el $O_2^{\cdot -}$ convirtiéndolo en H_2O_2 . Otras enzimas como son la catalasa y las

peroxidasas que reaccionan con el H_2O_2 convirtiéndolo en H_2O y O_2 , suelen variar en el sustrato de dónde obtienen los electrones para realizar esa reacción (Lesser, 2006). Las familias de las glutatión peroxidasas realizan la reducción de varias de las especies radicalarias mediante el uso del glutatión reducido (GSH) como reactivo (San Miguel y Martín Gil, 2009).

Existen también otras enzimas antioxidantes importantes que actúan inactivando metabolitos secundarios como las glutatión transferasas (GST), que se encuentran en el citoplasma de la célula, asociadas a membrana o en la mitocondria y que juegan un rol importante en el tratamiento de los subproductos de las EROs (Birben *et al.*, 2012).

- Defensas no enzimáticas

Las defensas antioxidantes también pueden ser moléculas que están en la célula y que reaccionan directamente con las EROs o sus intermediarios sin necesidad de hacerlo a través de enzimas (Halliwell y Gutteridge, 2015).

El GSH resulta ser uno de los más efectivos y abundantes antioxidantes no enzimáticos, que actúa reaccionando de forma libre con las EROs y como se mencionara previamente, interviniendo en la reacción con la enzima glutatión transferasa y regenerando el tocoferol y el ácido ascórbico (Birben *et al.*, 2012).

1.3.2 Alteraciones histopatológicas

La creciente evolución en el monitoreo y evaluación de los efectos tóxicos de distintos contaminantes en los ecosistemas acuáticos ha revelado la necesidad de utilizar biomarcadores apropiados, siendo las lesiones histopatológicas una herramienta cada vez más utilizada (Oropesa *et al.*, 2017). Por su ubicación y por las funciones de transporte que cumplen, las branquias son órganos adecuados para observar el efecto tóxico de un contaminante. El daño tisular de las branquias reduce el consumo de O_2 , la excreción de CO_2 e interrumpe la función osmoreguladora de los organismos acuáticos, pudiendo provocar entre otros efectos una disrupción de la regulación iónica en peces (Farombi *et al.*, 2007).

En particular, en algunos mejillones se han reportado cambios en el espesor o morfología del epitelio de los filamentos branquiales (Sunila, 1987; Svärth, 2003; Nogarol *et al.*, 2016), aunque no se reportaron específicamente mediciones en el espesor del epitelio branquial con contrastes estadísticos u observaciones realizadas en *M. edulis* provenientes de áreas contaminadas. En otras investigaciones se detectaron malformaciones como fusión de filamentos y crecimiento anormal de tejidos (hiperplasia), la mayoría relacionadas con la concentración de cobre en los mejillones (Sunila, 1987). La cantidad de hemocitos estaría correlacionada positivamente con varios factores antropogénicos, entre ellos algunos contaminantes ambientales. Se sabe que en *M. edulis*, los hemocitos están involucrados en la digestión de partículas extrañas, el transporte de materiales y la reparación de las heridas, puesto que son los primeros en migrar a cualquier parte dañada o infectada. Se observan también cantidades aumentadas de hemocitos en parasitosis y cómo relación a condiciones de estrés (Svärth, 2003a). La infiltración hemocitaria estaría además activada por contaminación con metales. Suelen aparecer hemocitos que transportan estos metales en los lisosomas (Sunila, 1987). En mejillones provenientes de áreas con impacto industrial se han reportado granulocitomas (aglomerado de hemocitos de tipo granular similares a leucocitos eosinófilos rodeados de una capa de colágeno) (Svärth, 2003b). Estos granulocitomas se observan también en infecciones por parásitos y por virus (Rasmussen, 1986), por lo cual se ha sugerido que es un mecanismo general de defensa contra cualquier partícula extraña que esté en cantidades suficientes para ser englobada. Otros estudios, en cambio, sugieren que estarían particularmente relacionados con los impactos antropogénicos costeros (Gilek *et al.*, 1992; Svärth y Johannesson, 2001).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general:

Se propone como objetivo general “Evaluar el efecto de los metales provenientes de la actividad antrópica en zonas costeras del Golfo San Matías (Río Negro) sobre parámetros metabólicos e histológicos en el mejillón *Mytilus edulis*”.

Objetivos particulares:

Objetivo 1: Evaluar el estado de las aguas costeras determinando la concentración de distintos metales en el agua y la bioacumulación de estos en distintos órganos de *M. edulis*.

Objetivo 2: Estudiar la relación de las respuestas antioxidantes y el daño oxidativo en distintos órganos de *M. edulis* con la presencia de metales en el medio acuático.

Objetivo 3: Estudiar la histopatología en distintos órganos de *M. edulis* relacionada con la presencia de metales en el medio acuático.

Para esto se pondrán a prueba las siguientes hipótesis:

Hipótesis 1. Los órganos de *M. edulis* presentan concentraciones de metales superiores en el sitio con mayor impacto antropogénico (Puerto del Este) que en el de menor impacto (Isla Mejillón).

Hipótesis 2. La presencia de metales en el medio acuático intensifica el desbalance oxidativo en distintos órganos de *M. edulis*.

Hipótesis 3. Los distintos órganos de *M. edulis* presentan alteraciones histológicas relacionadas con la presencia de metales en el medio acuático.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Sitios de muestreo

Se establecieron dos sitios de muestreo en las costas de la provincia de Río Negro (Argentina), con distinto grado de impacto antrópico. Las localidades escogidas fueron Bajo Olivera y el Puerto de San Antonio Este (Figura 4). El sitio Bajo Olivera se encuentra en la zona conocida como Isla Mejillón, ubicada a aproximadamente 11 km al sur de Las Grutas y es en la actualidad el principal lugar de extracción comercial de bivalvos en el norte del Golfo San Matías. La Isla Mejillón está a un kilómetro de la costa; su sustrato es rocoso, se encuentra a una profundidad aproximada de 10 m en pleamar y queda expuesta en bajamar. El Puerto de San Antonio Este está ubicado sobre la margen norte de la península de Villarino en la Bahía de San Antonio, a 35 km al este de Las Grutas, donde se nuclea la exportación de toda la fruta rionegrina. La obtención de muestras se realizó por buceo en los meses de julio de 2016 y marzo de 2017.

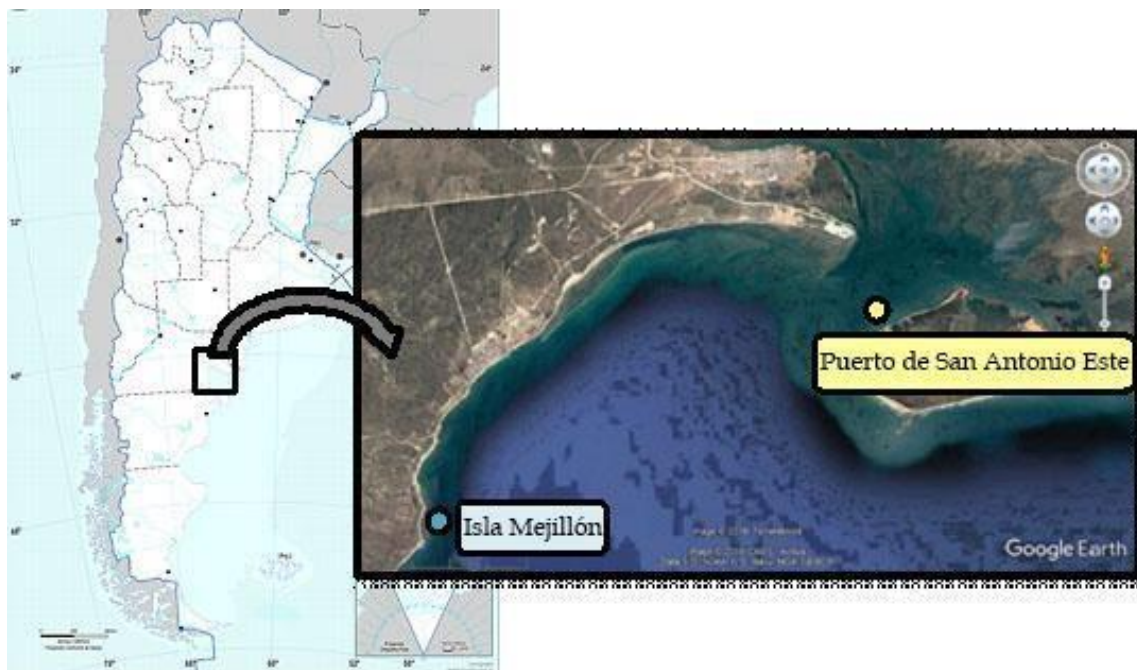


Figura 4. Mapa de Argentina con la ubicación de los sitios de estudio.

Con el fin de determinar las características físicas de los sitios de muestreo se registró la temperatura y profundidad de extracción de los ejemplares de *M. edulis* utilizando una computadora de buceo Tusa® modelo Zen Iq-900.

Debido a la estrecha relación entre la talla y la edad que existe en bivalvos (Soldati *et al.*, 2010), y sabiendo que la edad tiene un efecto sobre el balance oxidativo (Abele *et al.*, 2009), se realizaron muestreos de individuos de *M. edulis* escogiendo aquellos de tallas similares, en un rango de $5,60 \pm 0,67$ cm, dentro del cual se encuentran individuos adultos y sexualmente maduros.

Por otra parte, en los individuos colectados en los dos años se pudo observar una proporción de machos: hembras cercana a 1:1 en los dos sitios muestreados (prueba de t, $p > 0,05$). Con el objetivo de buscar si existían diferencias significativas en los parámetros metabólicos debido al sexo en *M. edulis*, en un trabajo preliminar se analizaron por separado los resultados obtenidos para machos y hembras. Se observó que al comparar los valores obtenidos de proteínas solubles totales - utilizado como normalizador de enzimas de estrés - y TBARS - estimador de peroxidación lipídica, no se encontraron diferencias significativas (prueba de t, $p > 0,05$) entre ambos sexos en ninguno de los tres órganos para ninguno de los dos sitios de muestreo. Por tal motivo, se decidió no discriminar por la variable sexo los resultados de la presente Tesis.

Las tareas de recolección de animales fueron realizadas por distintos integrantes del laboratorio de Enzimología, Estrés y Metabolismo del Departamento de Química Biológica de la FCEyN, UBA implicados en los proyectos de investigación (UBA 20020130100882BA, PICT-2014-3061) en los que se enmarca este trabajo de tesis. De cada sitio y época se colectaron muestras de agua, a la misma profundidad que los animales, para determinar la concentración total de metales en solución. Las muestras de agua fueron recogidas y almacenadas en botellas de plástico estériles (previamente lavadas con HNO_3 2 M). Para cada época y sitio de muestreo se colectaron 15 ejemplares de *M. edulis*. Los mismos se crio-anestesiaron previa a la disección. Se les registró el peso total, la talla y el peso húmedo individual de los órganos. De cada ejemplar se extrajo la glándula digestiva, las branquias y el manto (Figura 5). Una parte de cada órgano fue almacenada a -80°C para la determinación de parámetros metabólicos y otra parte fue fijada en Lison-Vokaer (ácido pícrico saturado en etanol 96%, solución de formaldehído al 40%, ácido acético glacial al momento de su utilización), que por ser un fijador alcohólico permite la conservación de hidratos

de carbono. Las muestras fueron transportadas al laboratorio. Las metodologías específicas para cada objetivo fueron llevadas a cabo por la tesista.

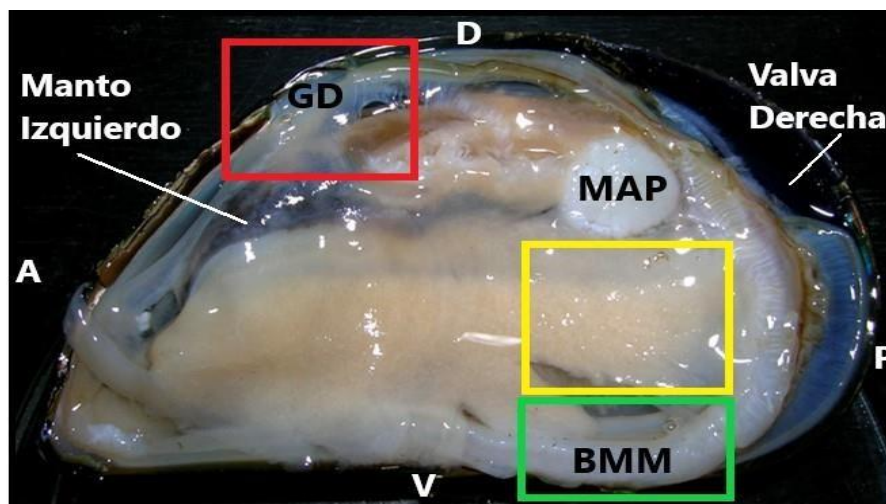


Figura 5: Foto del mejillón tomada luego de retirar la valva izquierda. Se indican en color las partes de los órganos que fueron seleccionadas para histología. En verde se marca el sector del manto, en amarillo la región de las branquias y en rojo el sector donde se encuentra la glándula digestiva. MAP: músculo aductor posterior; BMM: borde muscular del manto; GD: glándula digestiva.

2.2. Procesamiento de muestras

Transcurridas las 48 h de fijación, las muestras fueron pasadas a alcohol absoluto por 2 h, realizando un cambio de ese alcohol y luego 5 minutos de pasaje por benzol para luego ser incluidas en Paraplast® (Kendall) a 58°C por 4 h con un cambio. Finalmente se orientó cada pieza y se armaron los tacos para ser luego cortados y coloreados (ver sección 2.5 para histología).

Los homogenatos se realizaron con un homogeneizador motorizado teflón-vidrio Precytec (1500 rpm) en cloruro de potasio (KCl) 0,154 M con el agregado de inhibidores de proteasas (benzamidina 0,2 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,5 mM) en una relación 1:5 (peso/volumen). Los homogenatos fueron utilizados para la cuantificación de metales (Sección 2.6), mientras que las determinaciones de los parámetros de estrés oxidativo se realizaron sobre las fracciones solubles. Para esto se utilizó una microcentrífuga

refrigerada Herlmle, modelo Z216 a 11000 xg por 20 minutos a 4°C, y los sobrenadantes (extractos) fueron congelados a -15°C hasta el momento de las mediciones.

2.3. Parámetros a determinar

Todas las determinaciones de los parámetros de estrés oxidativo se realizaron en un espectrofotómetro modelo UV-160A de Shimadzu Corporation.

2.3.1. Determinación de proteínas totales

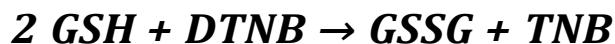
El contenido de proteínas solubles totales en los tres órganos se midió por el método de Bradford (1976) utilizando distinto volúmenes de extracto, de agua bidestilada y reactivo de Bradford (azul de Coomassie en etanol y ácido fosfórico) en cubetas plásticas de 1,5 mL. La absorbancia se midió a 595 nm. El contenido de proteínas se calculó a partir de una curva de calibración utilizando una solución estándar de albúmina sérica bovina (0,1 mg/mL). Los resultados se expresaron como mg de proteína/mL de homogenato.

2.3.2. Antioxidantes enzimáticos: Actividad glutatión-S-transferasa

La glutatión-S-transferasa (GST) cataliza la conjugación del glutatión endógeno a una variedad de compuestos electrofílicos, protegiendo las macromoléculas biológicas de sufrir daños oxidativos. La actividad GST se midió según la técnica de Habig *et al.* (1974). A 960 µL de buffer fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) se agregaron 10 µL de GSH (100 mM en buffer fosfato de potasio) y 10 µL de extracto. La reacción se inició agregando 10 µL de 1 cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB) (100 mM en etanol) y se siguieron los cambios en la absorbancia a 340 nm durante 120 segundos. Los resultados se expresaron como unidades GST/mg proteína. Una unidad GST se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la formación de 1 µmol de GS-DNB por minuto, a 25° C.

2.3.3. Antioxidantes no enzimáticos: Glutación reducido

Se determinó el contenido de glutación reducido (GSH) mediante el método de Anderson (1985) con algunas modificaciones, en presencia de 5, 5-ditiobis 2-ácido nitrobenzoico (DTNB):



Ecuación 2: generación de ácido 5- tio-2-nitrobenzoico a partir de glutación reducido y 5-ditiobis 2-ácido nitrobenzoico.

Donde el DTNB oxida al GSH generando un compuesto coloreado, el ácido TNB (5 tio-2-nitrobenzoico), que se monitorea a 412 nm. El extracto se acidificó con ácido sulfosalicílico al 10 %, y se centrifugó a 8000 xg durante 10 min. El sobrenadante ácido se mezcló con el ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) 6 mM en buffer sulfato de sodio 0,143M (con 6,3 mM EDTA), pH 7,5. La absorbancia a 412 nm se midió después de incubar las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente. El contenido de GSH se determinó mediante la utilización de una curva de calibración generada con una solución estándar de GSH. Los resultados se expresaron como nmol GSH /mg proteínas.

2.3.4. Evaluación de daño a lípidos. Determinación de TBARS

La peroxidación lipídica en extractos se determinó a través de la medición de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS, según sus siglas en inglés) a partir de la técnica modificada de Beuge y Aust (1978). Los productos de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (peróxidos lipídicos, entre los que se encuentra el malondialdehído (MDA) como producto mayoritario) reaccionan con el ácido tiobarbitúrico en medio ácido a altas temperaturas para dar un compuesto coloreado que puede cuantificarse a 535nm (Figura 6).

El extracto se incubó con ácido tiobarbitúrico (TBA), a 95 - 100 °C durante 45 minutos. Después de enfriarse la mezcla de reacción se centrifugó a 11000 x g por 10 minutos y se determinó la absorbancia del sobrenadante. La concentración de TBARS se estimó mediante el coeficiente de extinción del complejo

malondialdehído-ácido tiobarbitúrico ($156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los resultados se expresaron como nmol TBARS/mg proteínas.

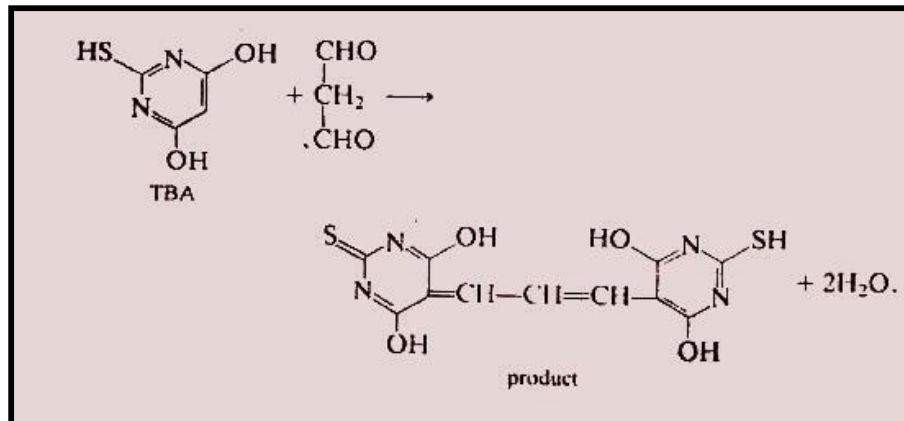


Figura 6. Reacción del malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA) que da un producto coloreado.

2.4. Cuantificación de las concentraciones de metales

La determinación de las concentraciones de metales se realizó mediante la técnica de espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, por sus siglas en inglés) en los tres órganos seleccionados (Türkmen y Ciminli, 2007) y en agua (Martin *et al.*, 1994). Se determinó la presencia y concentración de: cobre, cromo, níquel y zinc. Esta técnica cuantifica la totalidad del contenido de metal, sin discriminar ni entre las formas químicas (iones, complejos inorgánicos, compuestos orgánicos) ni entre las distintas especies de un mismo elemento (número de oxidación).

2.4.1. Digestión ácida

Cada homogenato fue colocado en una caja de petri previamente lavada con una solución de HNO₃ 5%. Luego se agregó a cada caja 9 mL de HNO₃ 65% y se las colocó en una plancha térmica a 90 °C ubicada en una campana de extracción de aire, hasta evaporación total y el mismo tratamiento se repitió dos veces. A continuación, se realizaron dos tratamientos con 9 mL de HNO₃ 32,5% y uno con 9 mL de HNO₃ 5% + 1,5 mL de H₂O₂ 12%. Por último, se llevó a volumen final con HNO₃ 5% (Di Salvatore *et al.*, 2013).

Para las muestras de agua se utilizó el mismo protocolo de acidificación que para los extractos de órganos y una vez finalizado, las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta que las determinaciones de la concentración de los distintos metales fueron realizadas.

2.4.2. Análisis de Espectroscopia de Emisión Óptica con Plasma Acoplado Inductivamente

Las determinaciones de las concentraciones de metales fueron realizadas por la Dra. Minaberry del Laboratorio de Trazas, INQUIMAE, DQIAQF, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. El material de laboratorio se lavó cuidadosamente y se utilizaron reactivos de grado analítico (especificaciones ACS). Las curvas estándar se construyeron utilizando soluciones de stock certificadas por Merck. Para superar las interferencias de la matriz, todos los reactivos utilizados para tratar las muestras se agregaron a los estándares de trabajo en las mismas proporciones.

Los metales se determinaron usando espectrometría de absorción atómica con atomización de horno de grafito (GFAAS, Shimadzu 6800) para níquel y cromo, y espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS) para cobre y zinc. Los parámetros instrumentales y los programas de horno de grafito fueron los proporcionados por el fabricante (Conti *et al.*, 2011, 2012). La trazabilidad de los resultados se obtuvo del análisis del material de referencia certificado Krill antártico MURSTISS-A2 (Programa de investigación italiano en la Antártida). Los porcentajes de recuperación promedio (cinco repeticiones) fueron de alrededor del 90-110%.

2.5 Observaciones histológicas y morfometría

Se realizaron cortes histológicos de 6 µm con un micrótopo Leica RM2125, los cuales fueron posteriormente desparafinados con dos cambios de xilol de 5 min cada uno e hidratados por 2 min en alcohol etílico 96°, 70° y agua destilada. Todos los pasajes fueron realizados en coplin. Se emplearon técnicas de coloración de rutina para observar la morfología general y técnicas especiales para la detección

de glicoconjugados. Para deshidratar se realizó el camino inverso que para la hidratación con el agregado de un pasaje de 2 min por alcohol absoluto para eliminar todo resto de agua antes de los respectivos pasos por xilol. Para montar se utilizó bálsamo de Canadá sintético (Biopack) y cubreobjetos acorde al tamaño de los cortes.

2.5.1 Técnicas histológicas

1- Hematoxilina eosina

Para esta técnica se utilizó hematoxilina de Carazzi por 10 min y luego un viraje en agua corriente hasta un cambio de color hacia el violeta, luego se coloreó con eosina alcohólica 0,25 % por 2 min. Finalmente se lavó con agua destilada, se deshidrató y montó.

2- Tricrómico de Masson modificado

Para esta técnica se utilizó hematoxilina de Carazzi por 5 min y luego un viraje en agua corriente, luego se coloreó con fucsina ácida ponceau de xilidina por 5 min y se lavó con agua destilada. Se sumergieron los cortes en ácido fosfomolibdico al 1%, que actuó como diferenciador y mordiente y sin lavar, se coloreó con azul de anilina acética por 5 minutos. Finalmente se lavó con agua destilada, se deshidrató y montó (Suvarna *et al.*, 2019).

3- Técnica histoquímica de ácido peryódico de Schiff (PAS)

En este caso, los cortes desparafinados e hidratados se pasaron por ácido peryódico al 0,5% por 5 min, luego por agua destilada y se coloreó con el reactivo de Schiff por 15 min, luego se lavaron con agua corriente y agua destilada, para pasar a la coloración nuclear con hematoxilina de Carazzi por 5 min con su viraje en agua común. Como colorante de contraste se usó verde luz por 20 a 30 segundos y se procedió a deshidratar y montar. Con esta técnica los glicoconjugados neutros se colorean de color magenta fuerte, los núcleos violetas y los citoplasmas verde claro (Suvarna *et al.*, 2019).

4- Técnica histoquímica alcian blue

Para esta coloración se utilizó una solución de alcian blue (azul de alcian) a pH 3,5 por 30 min, luego de lo cual se lavó con agua destilada y se coloreó con hematoxilina de Carazzi por 5 min, se pasó por agua corriente y luego se deshidrató y montó. Esta coloración nos permitió identificar los glicoconjugados ácidos en color azul turquesa intenso y los núcleos de color violeta.

5- Combinación PAS alcian blue

Para tener una mejor identificación de los glicoconjugados que componen los mucopolisacáridos de los mucocitos se realizó una técnica PAS y alcian blue. La misma se realizó coloreando primero con la técnica de azul alcian pH 3,5 y luego con PAS.

6- Técnica de Schmorl

Para la detección de lipofuscinas se usó una solución de cloruro férrico al 1% y una de ferricianuro de potasio al 0,4%. Como coloración de contraste se usó rojo neutro al 0,5%. Se mezclaron las dos primeras soluciones y se coloreó por 10 min. Se lavó con varias pasadas por agua corriente y se coloreó por 5 min con rojo neutro. Se volvió a lavar con agua destilada, se deshidrató y se montó. Las lipofuscinas se marcan de color azul oscuro.

7- Método de azul de nilo sulfúrico de Lillie

Se utilizó una solución de azul de nilo 0,05% en ácido sulfúrico al 1% y se coloreó por 20 min. Se lavó cuatro veces con agua destilada y se realizó un montaje temporal con glicerina (Lillie, 1956). Las lipofuscinas se colorean de azul claro.

2.5.2 Observaciones histopatológicas.

Para las observaciones morfológicas y toma de imágenes se utilizó el fotomicroscopio Zeiss Axioshop 2 del Laboratorio de la Dra. Sara Maldonado.

Se hizo énfasis en la detección de procesos inflamatorios como el aumento o agregación de hemocitos o granulocitomas, que indiquen la presencia de

partículas extrañas en los tejidos (Suvarna *et al.*, 2019; Rocchetta *et al.*, 2014). También se buscaron malformaciones, atrofias y fibrosis.

2.5.3 Morfometría

Para la morfometría se utilizó un microscopio Olympus ch-bl 45-3 anexo a un ocular con cámara de 1,3 MP (Touptek, China) y las imágenes se capturaron con el software Touptek toupview x64 3.7.5660 (<http://www.touptek.com/>) a 100x incluyendo la escala en μm . Las imágenes fueron procesadas con el software imageJ 1.52a (NIH EEUU; <https://imagej.nih.gov/ij/>).

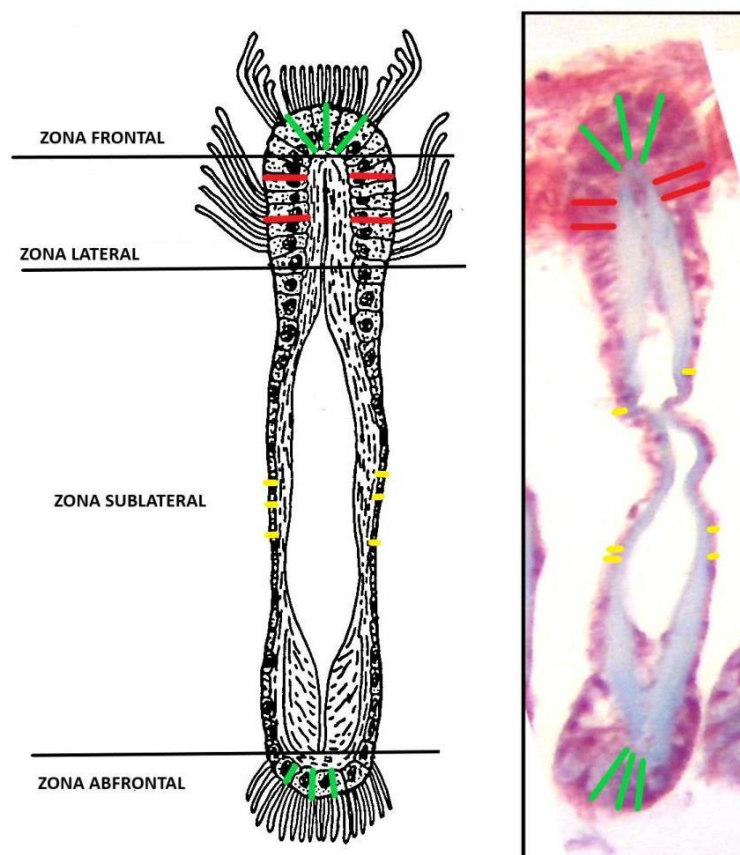


Figura 7: Esquema e imagen de corte transversal de un filamento capturado a 100X que detallan, en colores, las mediciones de los epitelios en las distintas zonas.

En las mismas se midió la altura del epitelio branquial en las cuatro zonas delimitadas según los autores Wright *et al.* (1987) y Owen (1974) con algunas modificaciones (Figura 7).

Las mediciones se realizaron en 5 filamentos de 2 cortes de cada individuo/sitio/época. Se realizarán 3 medidas en la zona frontal, 4 medidas en la zona lateral, 6 medidas en la zona sublateral y 3 en la zona abfrontal. También se tomaron medidas del largo total del filamento.

2.6. Análisis estadístico

Para cada ensayo cuantitativo se calcularon los promedios, el desvío estándar y se graficaron utilizando el graphpad prism 6. Con el objeto de comparar estadísticamente los resultados se analizaron las variables teniendo en cuenta los sitios de muestreo y la época mediante análisis de la varianza (ANOVA) de II factores (Sokal y Rohlf, 1999). En el caso de la concentración de zinc en agua al no contar con todos los valores para realizar el ANOVA, se realizó un test de Student para comparar los valores del año que sí podíamos comparar.

Para las comparaciones que resultaron significativas ($p < 0,05$) se realizaron contrastes a posteriori de Tukey. Los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianza se probaron con las pruebas Lillieford y Bartlett, para el análisis estadístico se utilizó el software Statistica v.7.

3. RESULTADOS

3.1. Características morfométricas de *M. edulis*, profundidad de extracción y temperatura media de los sitios de muestreo

En la Tabla 1 se muestran las temperaturas promedio del agua y las profundidades a las que se realizaron los muestreos en los dos sitios estudiados (IM: Isla Mejillón; PE: Puerto del Este), para los meses de julio de 2016 y marzo de 2017, así como también las tallas de los animales capturados. Se puede observar un incremento en las temperaturas registradas en marzo por corresponder a la temporada estival respecto del mes de julio, que es la temporada invernal.

	<i>julio-16</i>		<i>marzo-17</i>	
	IM	PE	IM	PE
Temp. Media (°C)	10,2 ± 2,4	9,5 ± 3,6	20,1 ± 3,1	19,7 ± 3,3
Profundidad (mts)	9,0 ± 0,5	9,0 ± 0,5	9,0 ± 0,5	9,0 ± 0,5
Largo (cm)	5,49 ± 0,66	5,78 ± 0,82	5,53 ± 0,62	5,58 ± 0,54
Ancho (cm)	1,99 ± 0,25	2,15 ± 0,33	2,07 ± 0,41	2,27 ± 0,27
Alto (cm)	2,73 ± 0,54	2,66 ± 0,48	2,81 ± 0,34	2,59 ± 0,41

Tabla 1. Temperaturas del agua y profundidades de extracción de ejemplares en los sitios Isla Mejillón (IM) y Puerto del Este (PE) en julio de 2016 y marzo de 2017; tallas de los ejemplares de *M. edulis* colectados (expresadas como media ± desvío estándar).

3.2. Contenido de metal

En la Tabla 2 se presentan los valores de las concentraciones de los cuatro metales medidos en agua y en los tres órganos analizados. Como la concentración de zinc en julio 2016 fue menor al valor del blanco de reactivos, no se pudo realizar el ANOVA y entonces se realizó un test de t entre sitios para los valores del 2017.

3.2.1. Concentración de metales en el agua

De los cuatro metales analizados en el agua (Tabla 2), níquel, cromo y zinc mostraron el mismo patrón, registrándose concentraciones significativamente mayores ($p < 0,05$) en el sitio PE con respecto a IM. Sólo se detectó cobre en PE en 2017.

3.2.2. Concentración de metales en órganos de *M. edulis*

La acumulación de cobre y cromo en branquias y glándula digestiva predominó en los animales colectados en el sitio PE en ambas temporadas ($p < 0,05$). En cambio, ni el níquel ni el zinc mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los dos órganos mencionados ni entre sitios ni entre temporadas. (Tabla 2).

En el análisis del contenido de metales en el manto (Tabla 2) se observa que el cobre y el zinc mostraron valores significativamente mayores ($p < 0,05$) en los mejillones del sitio PE en ambas temporadas. Por su parte el cromo mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre temporadas, siendo los valores más altos los correspondientes a 2017 para ambos sitios. El contenido de níquel no varió en ningún caso ($p > 0,05$).

	Metal	IM		PE	
		julio-2016	marzo-2017	julio-2016	marzo-2017
Agua	Cu	<B	<B	<B	1,19 ± 0,18
	Cr	5,61 ± 0,29 ^a	5,91 ± 0,18 ^a	8,87 ± 0,29 ^b	7,19 ± 0,18 ^b
	Ni	1,01 ± 0,14 ^a	0,77 ± 0,29 ^a	3,48 ± 0,09 ^b	2,05 ± 0,24 ^b
	Zn	no se detectó	3,12 ± 0,29	10,88 ± 0,22	6,54 ± 0,17 *
Branquia	Cu	1,32 ± 0,01 ^a	1,12 ± 0,66 ^a	2,37 ± 1,31 ^b	4,33 ± 0,86 ^b
	Cr	0,49 ± 0,21 ^a	1,11 ± 0,49 ^a	1,24 ± 0,12 ^b	1,32 ± 0,33 ^b
	Ni	1,21 ± 0,19	1,63 ± 0,48	0,94 ± 0,49	1,23 ± 0,02
	Zn	29,88 ± 9,53	28,43 ± 4,77	32,11 ± 5,30	26,51 ± 7,01
Glándula digestiva	Cu	2,37 ± 0,65 ^a	2,81 ± 0,75 ^a	6,65 ± 1,48 ^b	6,12 ± 2,72 ^b
	Cr	0,67 ± 0,38 ^a	1,13 ± 0,02 ^a	3,95 ± 3,05 ^b	3,77 ± 0,81 ^b
	Ni	1,31 ± 0,25	2,89 ± 0,05	2,33 ± 1,61	1,99 ± 0,88
	Zn	24,06 ± 6,75	16,01 ± 3,16	23,91 ± 10,37	22,02 ± 6,82
Manto	Cu	2,17 ± 1,03 ^a	2,32 ± 1,17 ^a	3,95 ± 1,94 ^b	5,21 ± 1,63 ^b
	Cr	0,11 ± 0,07 ^a	1,43 ± 0,69 ^b	0,97 ± 0,27 ^a	2,31 ± 1,69 ^b
	Ni	1,10 ± 0,58	1,28 ± 0,43	1,18 ± 0,27	1,18 ± 0,71
	Zn	8,68 ± 3,77 ^a	9,61 ± 8,23 ^a	24,34 ± 7,55 ^b	29,36 ± 8,70 ^b

Tabla 2. Concentración de metales en agua ($\mu\text{g/L}$) y en órganos ($\mu\text{g/g}$ de peso húmedo) de *M. edulis* colectados en los sitios Isla Mejillón (IM) y Puerto del Este (PE) en julio de 2016 y marzo de 2017. Los valores se expresan como promedio \pm desvío estándar ($n = 4$). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). <B = valores inferiores al blanco. El asterisco (*) indica diferencia significativa entre sitios para valores del año 2017.

3.3 Contenido de proteínas en distintos órganos de *M. edulis*

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el contenido de proteínas totales para ninguno de los órganos analizados teniendo en cuenta el sitio o la temporada (Figura 8A: branquia, B: glándula digestiva y C: manto). El contenido de proteínas totales se expresó en mg/mL de homogenato y se utilizó para relativizar las mediciones posteriores.

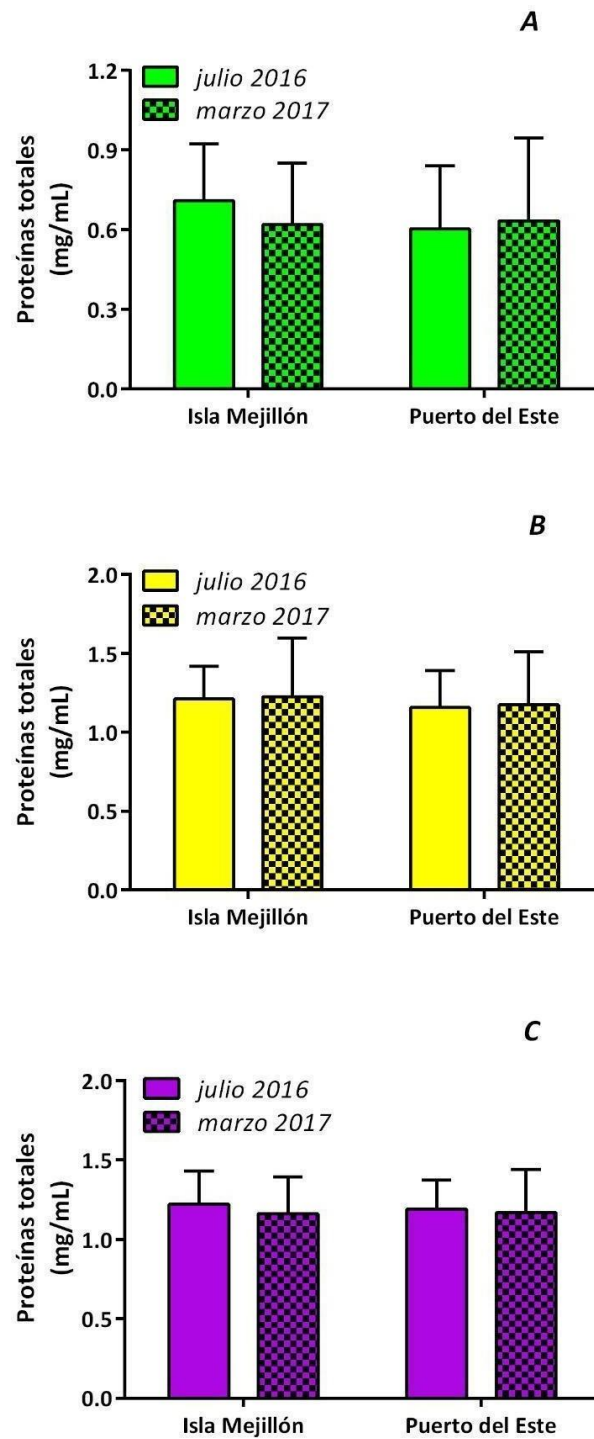


Figura 8. Concentración de proteínas solubles totales (mg/mL homogenato) en branquias (A), glándula digestiva (B) y manto (C) de *M. edulis* colectados en los sitios Isla Mejillón (IM) y Puerto del Este (PE) en julio de 2016 y marzo de 2017. Los valores se expresaron como el promedio \pm desvío estándar (n = 15).

3.4. Defensas antioxidantes en distintos órganos de *M. edulis*

Se analizaron como parámetros de respuestas enzimáticas antioxidantes la actividad glutatión-s-transferasa (GST), y como parámetro de respuesta antioxidante no enzimática, el contenido de glutatión reducido (GSH).

3.4.1. Actividad GST

La actividad GST mostró respuestas diferentes dependientes del órgano en que fue analizada. En branquias y en glándula digestiva la actividad GST no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre sitios ni entre temporadas, mientras que en el manto se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los sitios, registrándose los mayores valores en el sitio PE para ambas temporadas (Figura 9A, B y C).

3.4.2. Contenido de GSH

Los niveles de glutatión reducido (GSH) también mostraron respuestas diferentes dependientes del órgano en que fue analizado, En el caso de las branquias, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre temporadas, registrándose los valores más bajos en verano (Figura 10A).

Por su parte en glándula digestiva el contenido de GSH fue significativamente menor ($p < 0,05$) en Puerto del Este respecto de Isla Mejillón y lo mismo ocurrió al comparar verano con invierno en cada sitio (Figuras 10B).

El contenido de GSH del manto fue similar en los todos los casos ($p > 0,05$) (Figuras 10C).

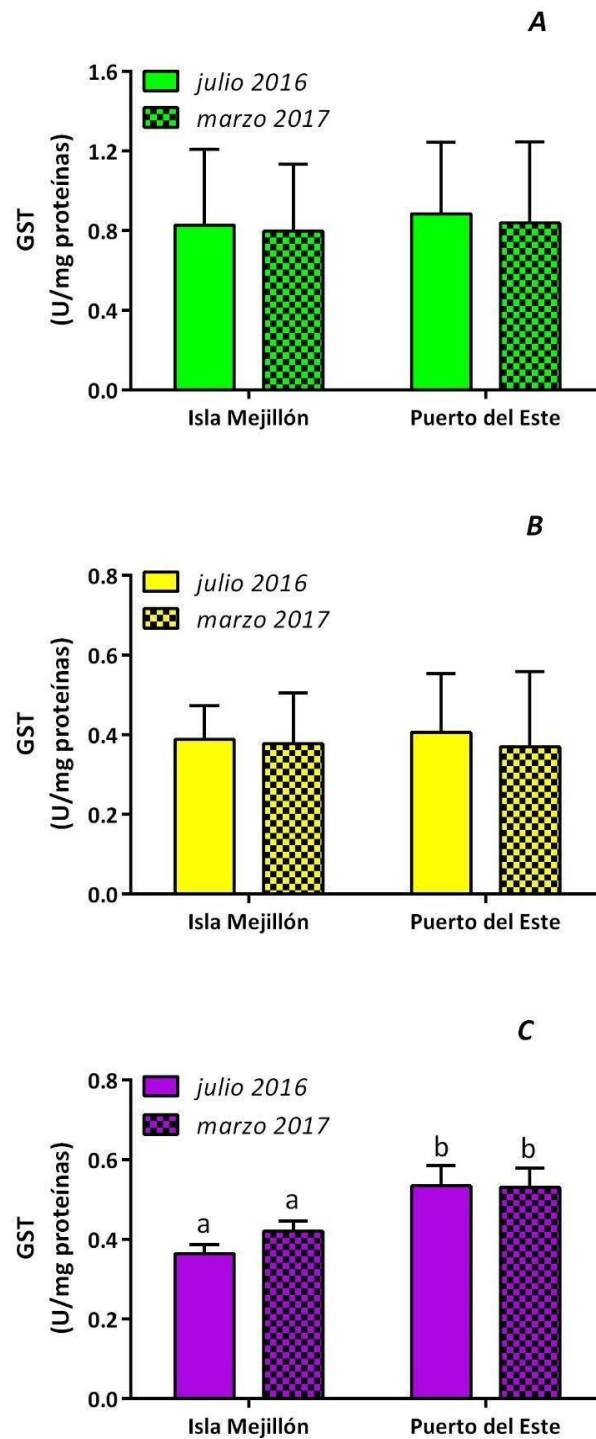


Figura 9. Actividad glutatión-S-transferasa (U GST/mg proteínas) en branquias (A), glándula digestiva (B) y manto (C) de *M. edulis* colectados en los sitios Isla Mejillón (IM) y Puerto del Este (PE) en julio de 2016 y marzo de 2017. Los valores se expresaron como el promedio \pm desvío estándar ($n = 15$). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

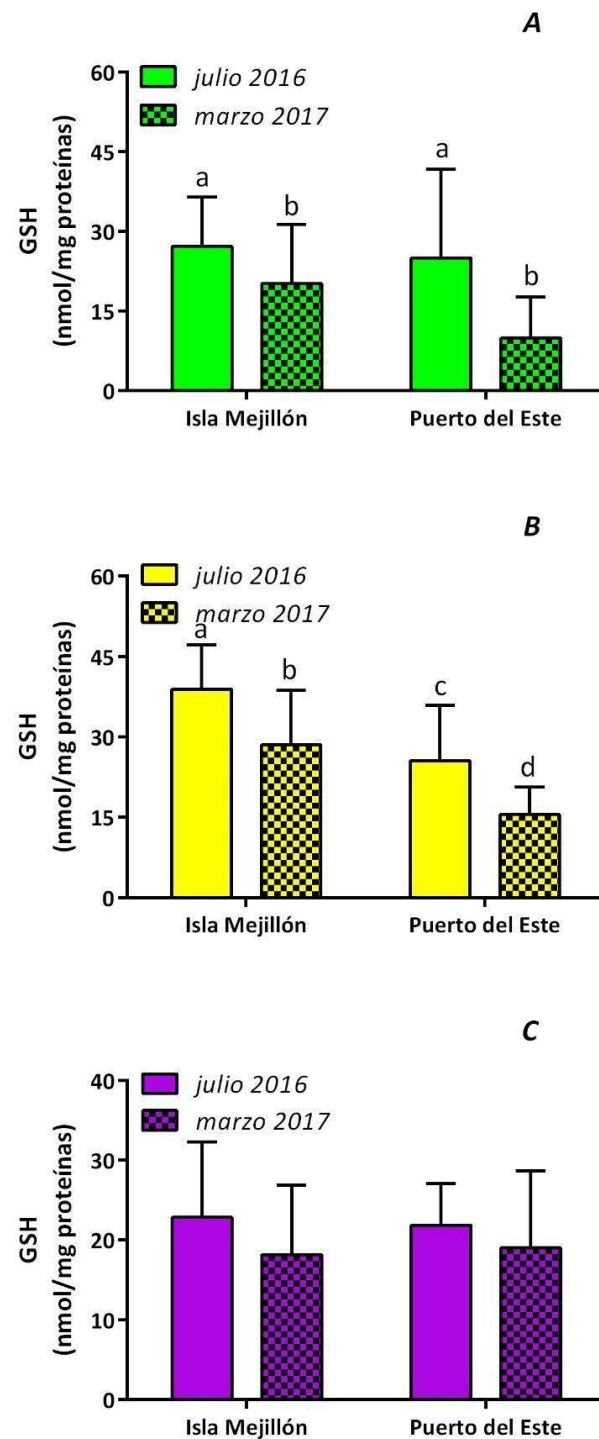


Figura 10. Contenido de glutatión reducido GSH en nmol GSH/mg proteínas de branquias (A), glándula digestiva (B) y manto (C) de *M. edulis* colectados en los sitios Isla Mejillón (IM) y Puerto del Este (PE) en julio de 2016 y marzo de 2017. Los valores se expresaron como el promedio \pm desvío estándar ($n = 15$). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.5. Peroxidación lipídica en distintos órganos de *M. edulis*

Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el daño oxidativo a lípidos en branquia, glándula digestiva y manto. El contenido de TBARS fue mayor ($p < 0,05$) en branquias de mejillones provenientes del Puerto del Este comparado con el otro sitio sólo en el invierno de 2016 (Figura 11A). Por su parte el contenido de TBARS en la glándula digestiva y en el manto mostró una respuesta similar, registrándose los mayores valores ($p < 0,05$) en el Puerto del Este, independientemente de la temporada (Figura 11B y C).

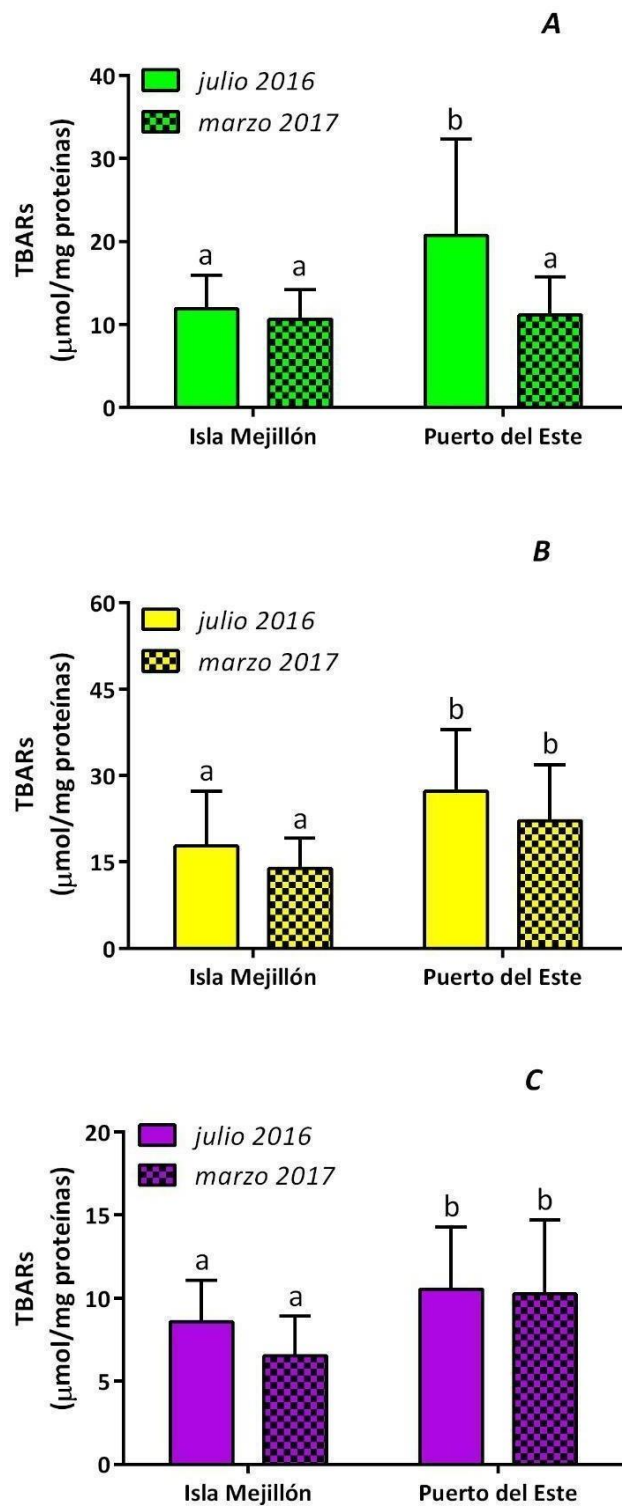


Figura 11. Contenido de TBARS ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteínas) en branquias (A), glándula digestiva (B) y manto (C) de *M. edulis* colectados en los sitios Isla Mejillón (IM) y Puerto del Este (PE) en julio de 2016 y marzo de 2017. Los valores se expresaron como el promedio \pm desvío estándar ($n = 15$). Letras distintas indican diferencias significativas.

3.6. Observaciones histológicas y morfometría

3.6.1. Observaciones histológicas

La figura 12 muestra una laminilla de la branquia de *M. edulis* de IM formada por numerosos filamentos tubulares, conectados eventualmente por uniones interlaminillares. El epitelio de la zona frontal y lateral es simple cilíndrico y presenta cilias de distinta longitud. Se observan uniones ciliares interfilamentales. La zona sublateral presenta un epitelio simple plano. La zona abfrontal muestra un epitelio simple cilíndrico. Hay escasos mucocitos en la zona frontal, algunos contienen glicoconjugados ácidos, otros glicoconjugados neutros. En la transición de la zona lateral a la sublateral hay mucocitos conteniendo glicoconjugados mezcla. La zona abfrontal es la que presenta mucocitos de gran tamaño, algunos con glicoconjugados neutros, otros ácidos y otros mixtos. Esto queda en evidencia con la combinación de PAS-alcian blue (Figura 19).

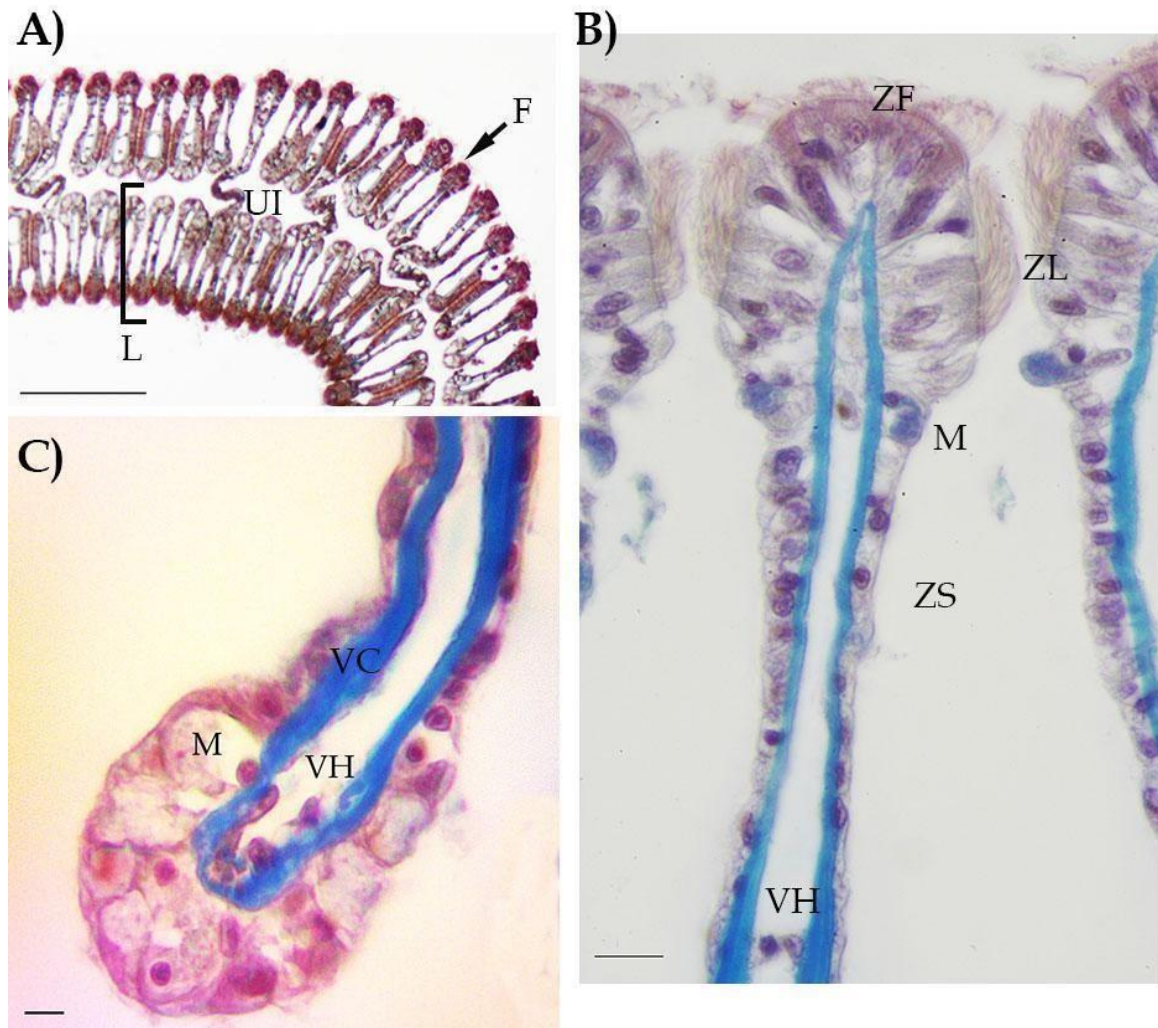


Figura 12: A) Corte transversal de branquia de *M. edulis* capturado en Isla Mejillón. Se observa la estructura general de una hemibranchia mostrando las laminillas (L), los filamentos (F) y las uniones interlaminillares (UI). B) Detalle de un filamento branquial en el cual se observa la zona frontal (ZF), lateral (L) y sublateral (ZS). Se pueden observar los distintos tipos de cilias. Se observan escasos hemocitos en el vaso hemolinfático (VH). C) Zona abfrontal del filamento en la que se observan numerosos mucocitos (M). En azul se observa la varilla de sostén de conquiolina (VC) coloreada con azul de anilina. Coloración: Tricrómico de Masson modificado. Barra= A) 200 μm , B) 10 μm y C) 5 μm .

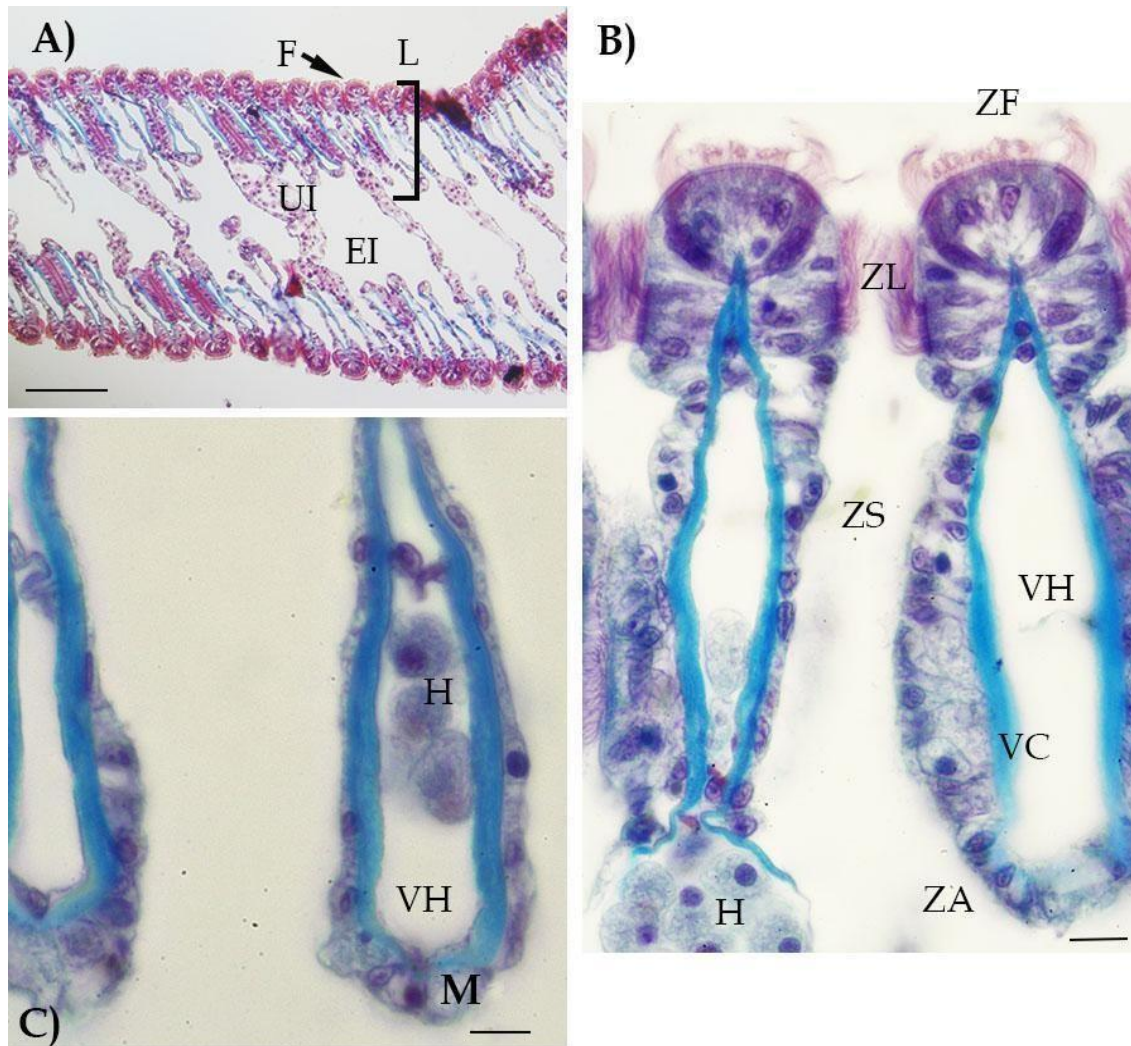


Figura 13: A) Corte transversal de branquia de *M. edulis* capturado de Puerto de San Antonio Este. Se observan las laminillas (L), los filamentos (F) y las uniones inter (UI) con infiltración hemocitaria. También se observa el espacio interlaminillar (EI). B) Detalle de dos filamentos branquiales en los cual se observa la zona frontal (ZF), lateral (L), sublateral (ZS) y abfrontal (ZA). En azul se observa la varilla de sostén de conquiolina (VC). El vaso hemolinfático (VH) del filamento izquierdo presenta numerosos hemocitos (H). C) Zona abfrontal del filamento en la que se observan escasos mucocitos (M) pequeños. Coloración: Tricrómico de Masson modificado. Barra= A) 50 μm , B) 10 μm y C) 10 μm .

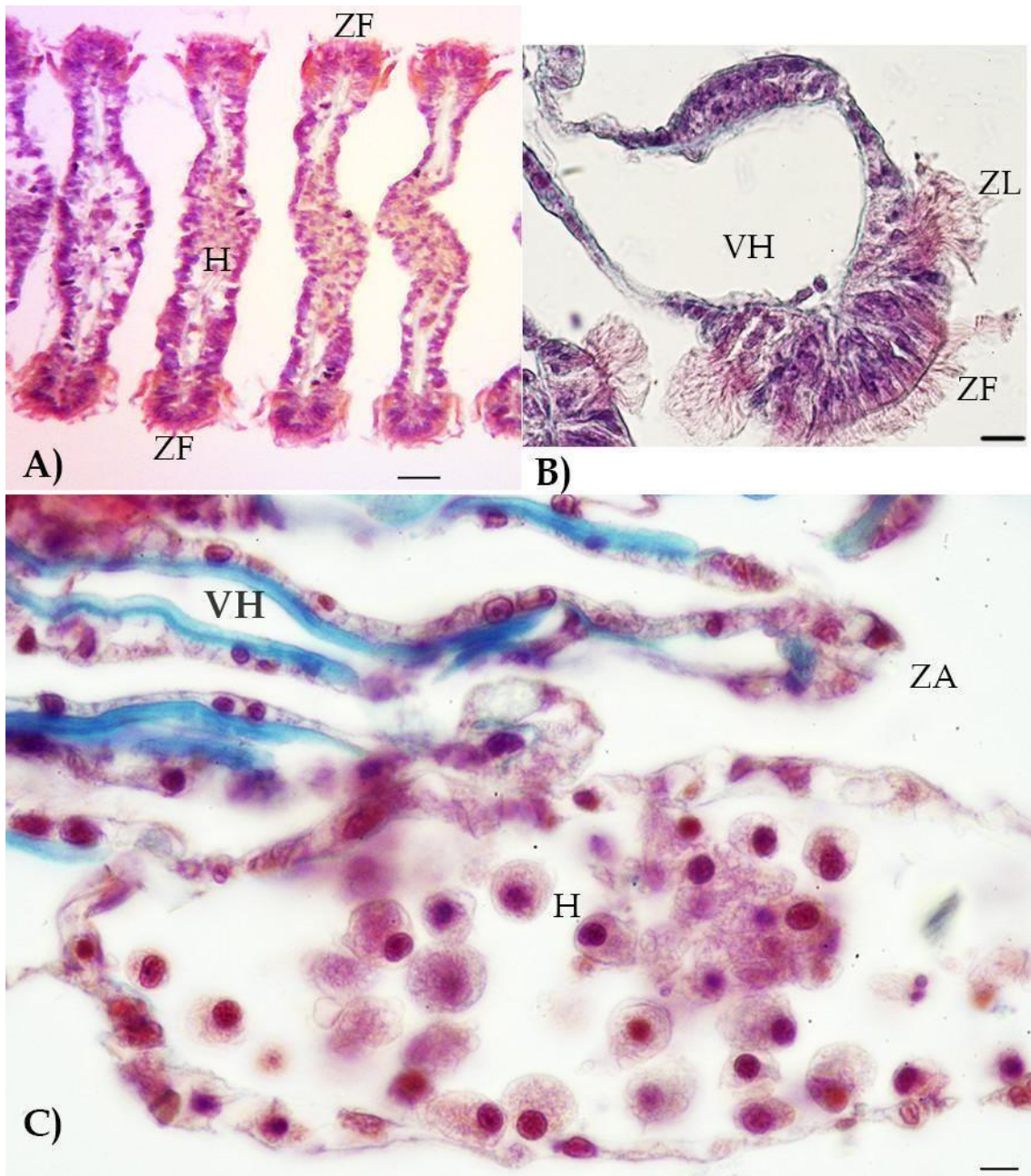


Figura 14: Alteraciones en las branquias de *M. edulis* capturados en Puerto de San Antonio Este. A) Filamentos con uniones interlaminares invadidas por hemocitos (H). B) Detalle de filamento que muestra la zona lateral (ZL) y la fusión por la zona frontal (ZF) con dilatación del vaso hemolinfático (VH). C) Detalle de unión interlaminares dilatada y cargada de hemocitos. Se observan también unas zonas abfrontales (ZA) adelgazadas en los filamentos contiguos. Coloración: Tricrómico de Masson modificado. Barra= A) 20 μ m, B) 10 μ m y C) 5 μ m.

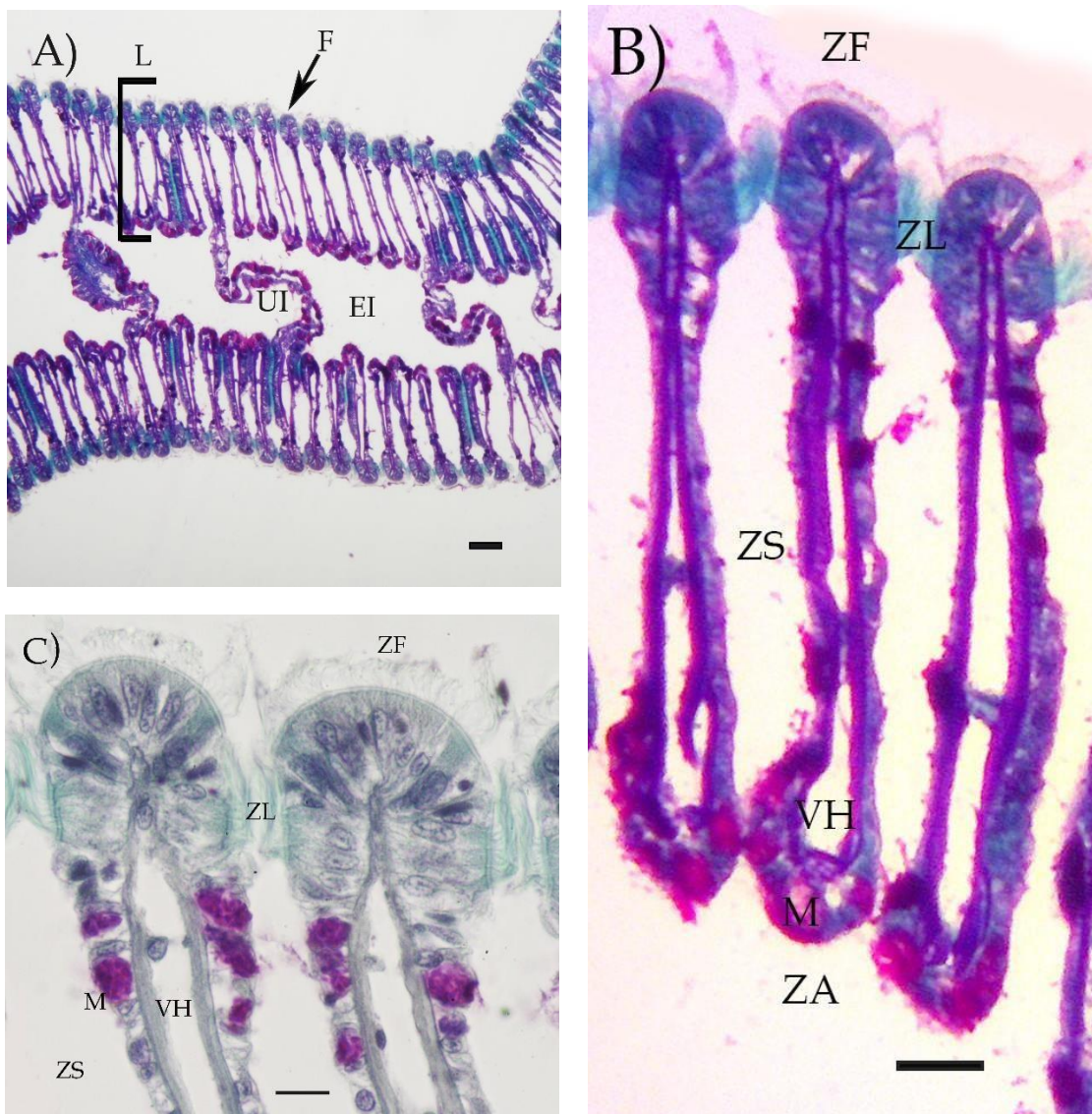


Figura 15: Corte transversal de branquia de *M. edulis* de Isla Mejillón. A) Aspecto general de una hemibranchia mostrando las laminillas (L), los filamentos (F), las uniones interlaminillares (UI). B) Detalle de tres filamentos completos mostrando las cuatro zonas: frontal (ZF), lateral (ZL), sublateral (ZS) y abfrontal (ZA). En ZA y principios de la ZS se observan mucocitos (M) PAS positivos. C) Detalle de las tres primeras zonas, se observan mucocitos PAS positivo en el comienzo de la ZS. Coloración: PAS-verde luz. Barras= A) 50 μm , B) 20 μm y C) 10 μm .

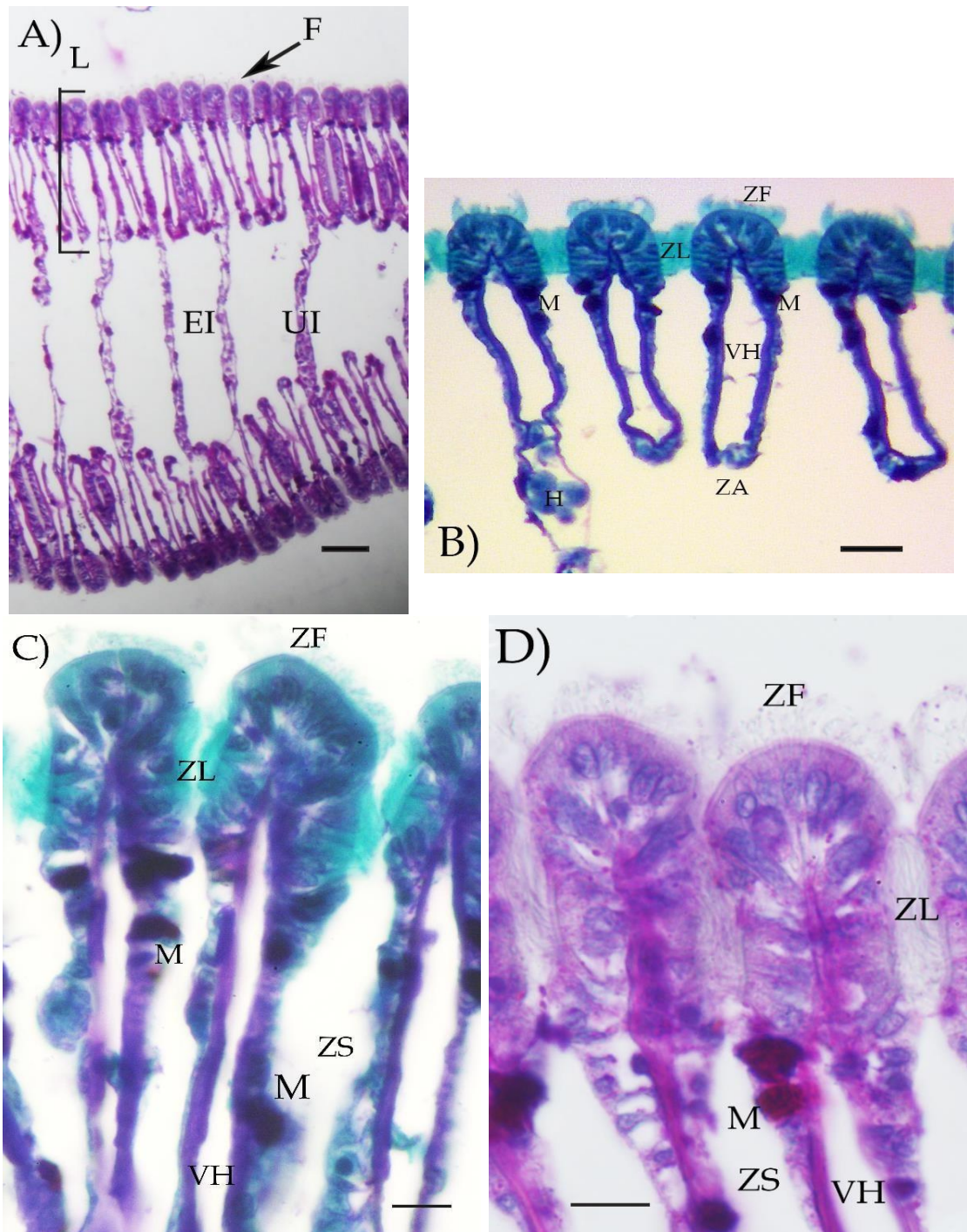


Figura 16: Corte transversal de branquia de *M. edulis* de Puerto de San Antonio Este. A) Aspecto general mostrando las laminillas (L), los filamentos (F), las uniones interlaminillares (UI). B) Detalle de cuatro filamentos mostrando las zonas: frontal (ZF), lateral (ZL), sublateral (ZS) y abfrontal (ZA). En ZA y principios de la ZS se observan mucocitos (M) PAS positivos y hemocitos en vaso hemolinfático de la izquierda. C) y D) Detalle de mucocitos PAS positivo en el comienzo de la ZS. Coloración: PAS-verde luz, excepto D) PAS solo.

Barras= A) 50 μm , B) 20 μm , C) y D) 10 μm .

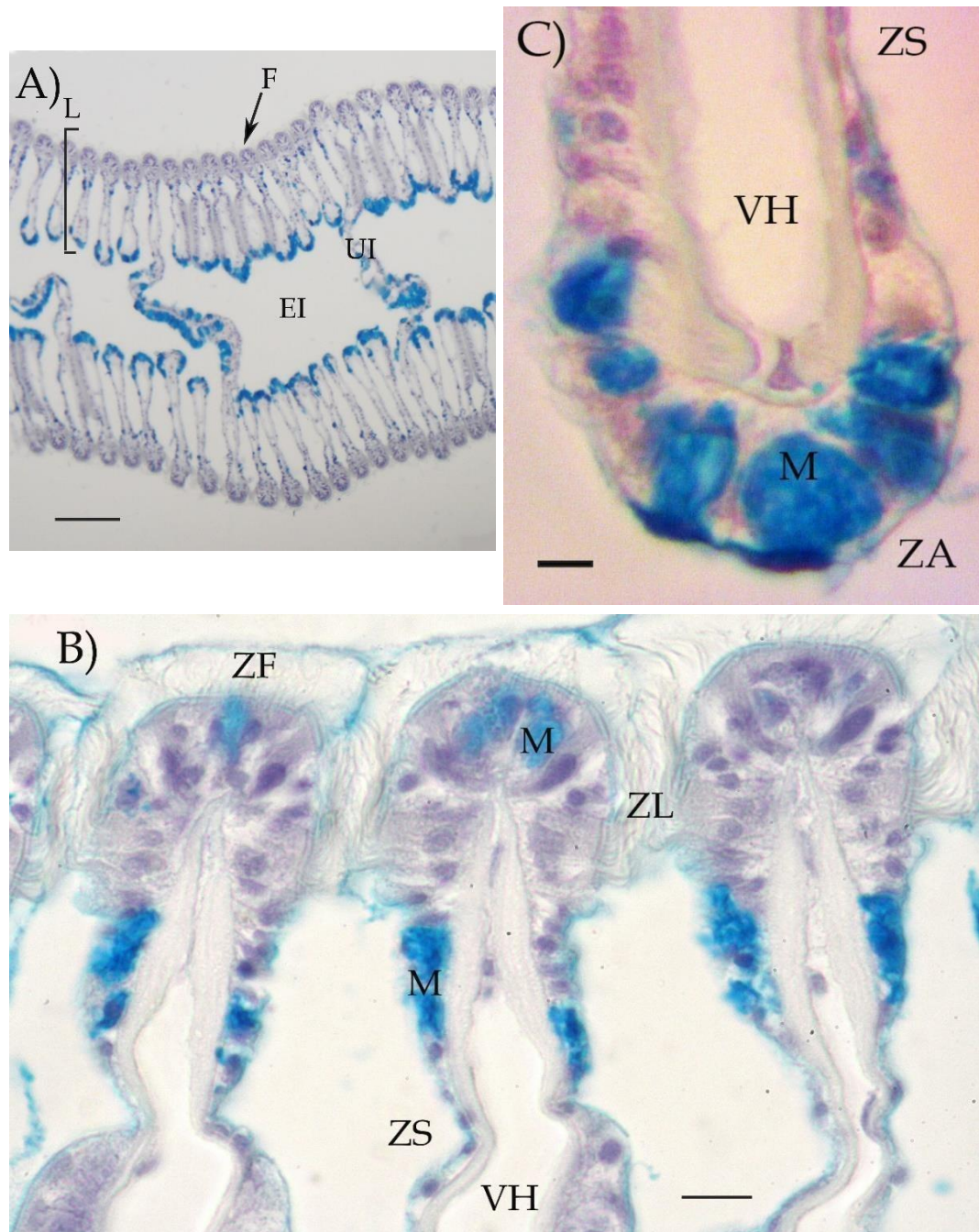


Figura 17: Corte transversal de branquia de *M. edulis* de Isla Mejillón. A) Aspecto general de una hemibranchia mostrando las laminillas (L), los filamentos (F), las uniones interlaminillares (UI) . B) Detalle de las tres primeras zonas de los filamentos frontal (ZF), lateral (ZL), sublateral (ZS). En ZF y principios de la ZS se observan mucocitos (M) alcian blue positivos. C) Detalle de zona abfrontal (ZA), se observan numerosos mucocitos alcian blue positivos. Coloración: alcian blue-hematoxilina. Barras= A) 100 μ m, B) 10 μ m y C) 5 μ m.

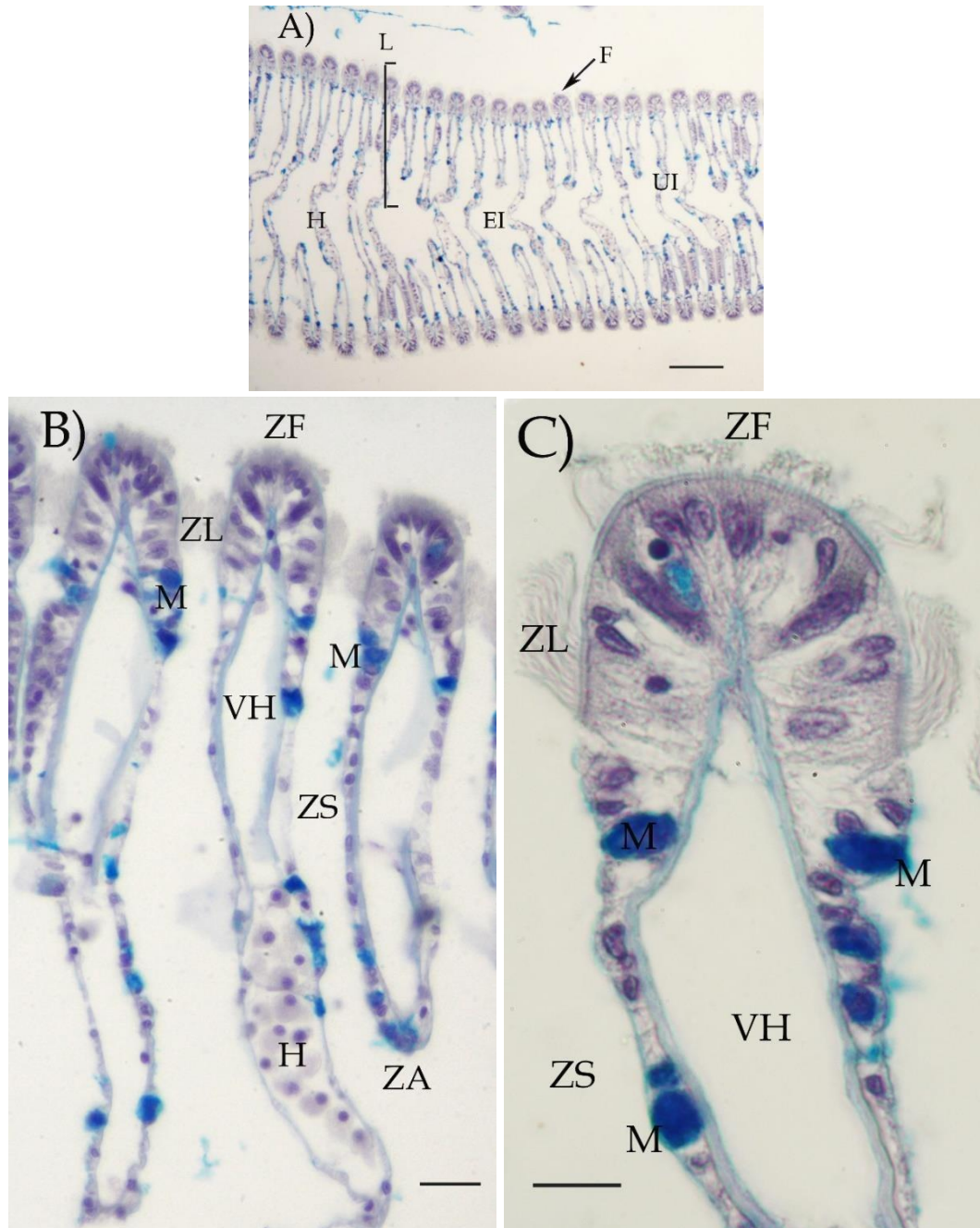


Figura 18: Corte transversal de branquia de *M. edulis* de Puerto de San Antonio Este. A) Aspecto general de una hemibranchia mostrando las laminillas (L), los filamentos (F), las uniones interlaminillares (UI). Se observan hemocitos (H) en las uniones. B) Detalle de las zonas frontal (ZF), lateral (ZL), sublateral (ZS) y abfrontal (ZA). A comienzos de la ZS se observan mucocitos (M) alcian blue positivos. C) Detalle de mucocitos. Coloración: alcianblue-hematoxilina. Barras= A) 100 μ m, B) 20 μ m y C) 10 μ m.

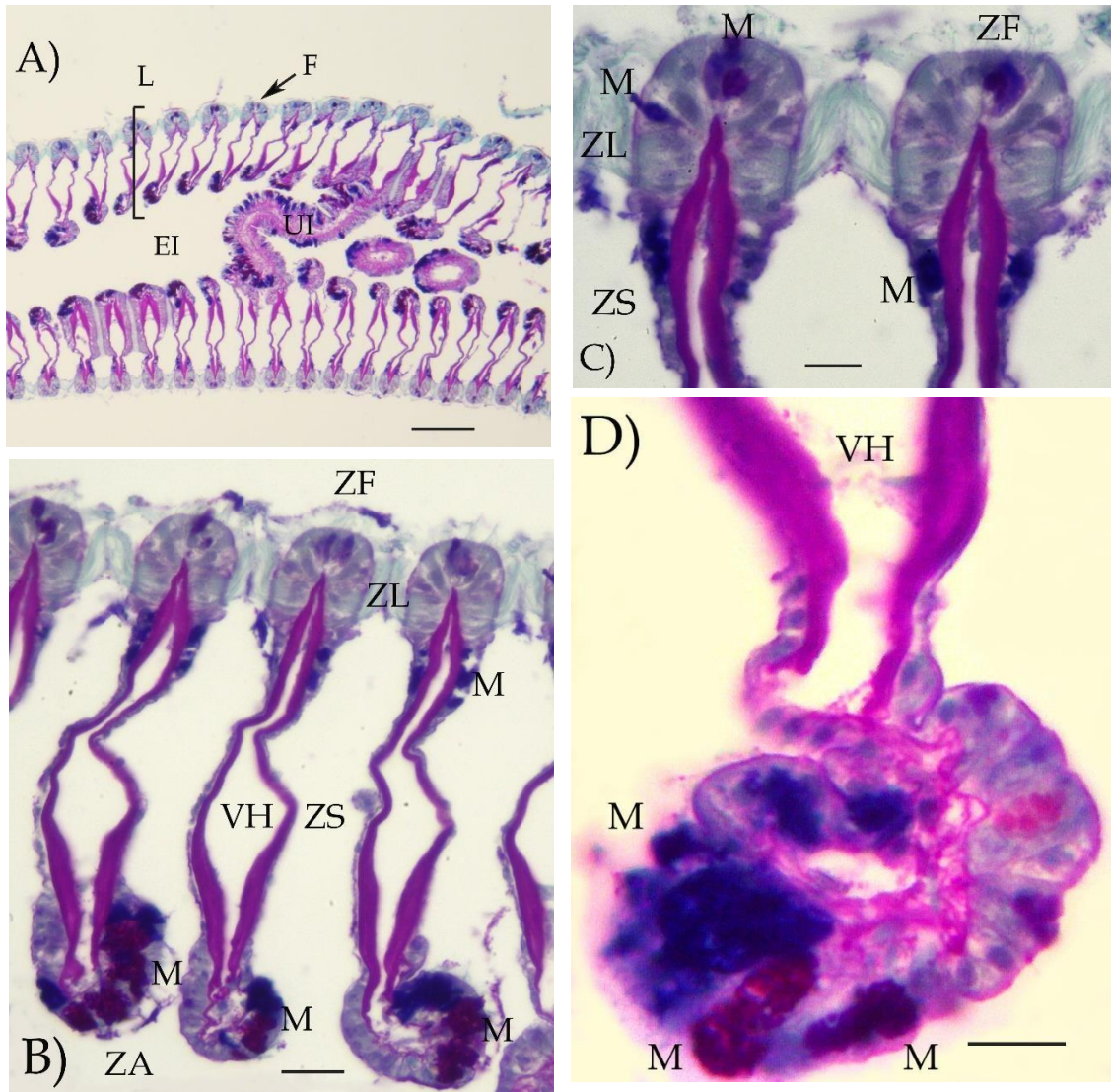


Figura 19: Corte transversal de branquia de *M. edulis* de la IM. A) Aspecto general de una hemibranquia mostrando las laminillas (L), los filamentos (F), las uniones interlaminillares (UI). B) Detalle de las zonas frontal (ZF), lateral (ZL), sublateral (ZS) y abfrontal (ZA). Se observan mucocitos (M) mixtos en comienzo de la ZS y en la ZA. C) Detalle de la ZF, la ZL y la ZS. D) Detalle de la ZA con mucocitos de los tres tipos, PAS positivos (magenta), alcian blue positivos (azules) y mixtos (violetas). Coloración: PAS-alcian blue-hematoxilina. Barras= A) 100 μm , B) 20 μm , C) y D) 10 μm .

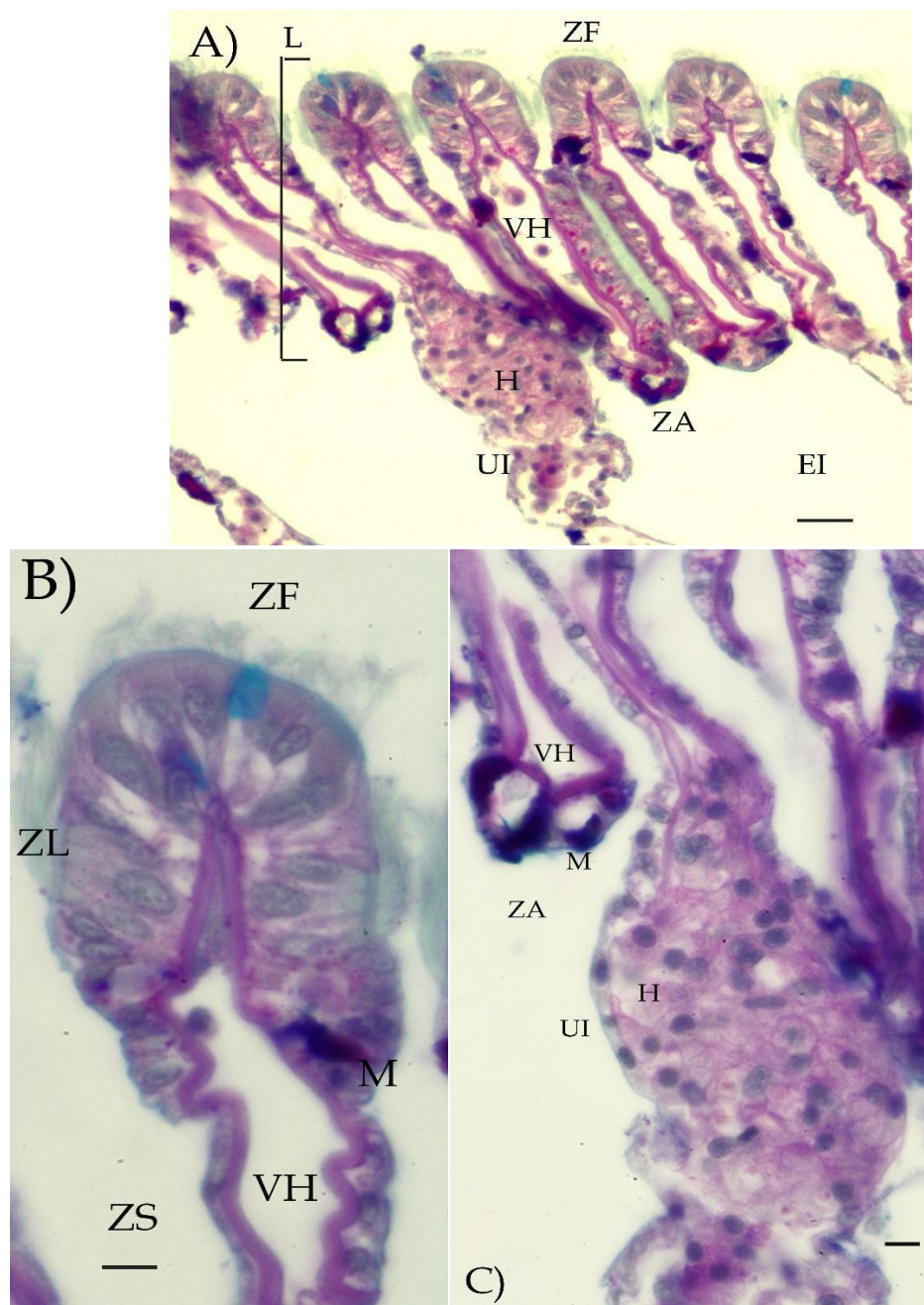


Figura 20: Corte transversal de branquia de *M. edulis* de Puerto de San Antonio Este. A) Aspecto general de una laminilla (L) mostrando los filamentos (F) y las uniones interlaminillares (UI) gruesas. B)Detalle de las zonas frontal (ZF), lateral (ZL), sublateral (ZS) con mucocitos (M) mixtos en comienzo de la ZS. C) Detalle de la unión interlaminillar (UI) con numerosos hemocitos infiltrados (H). Se observa además la zona abfrontal (ZA) con mucocitos mixtos. Los trestipos, PAS positivos (magenta), alcian blue positivos (azules) y mixtos (violetas). Coloración: PAS-alcian blue-hematoxilina. Barras= A) 20 μm, B) 10 μm y C) 5 μm.

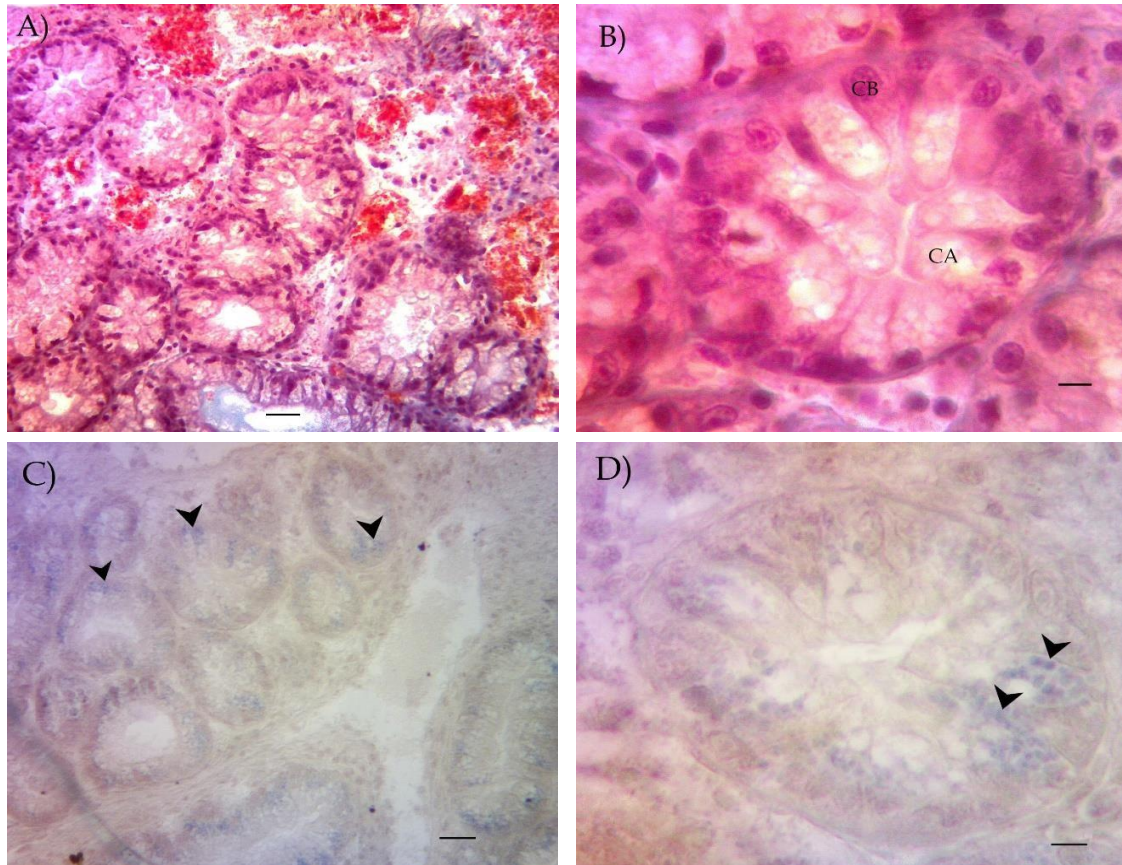


Figura 21: Corte transversal de glándula digestiva de *M. edulis* extraído de IM. A) Aspecto general en los que se ven los túbulos digestivos y en rojo las células de reserva energética. B) Detalle de un túbulo en el cual se observan células basófilas triangulares (CB) y células absortivas vacuoladas (CA). C) Aspecto general de glándula digestiva. Las puntas de flecha señalan los gránulos de lipofuscinas. D) Detalle de túbulo en el que se observan los escasos gránulos de lipofuscinas marcados con puntas de flecha. A) y B) Coloración tricrómico de Masson modificado. C) y D) Azul de Nilo de Lillie, Barra = A) y C) 20 μ m, B) y D) 5 μ m.

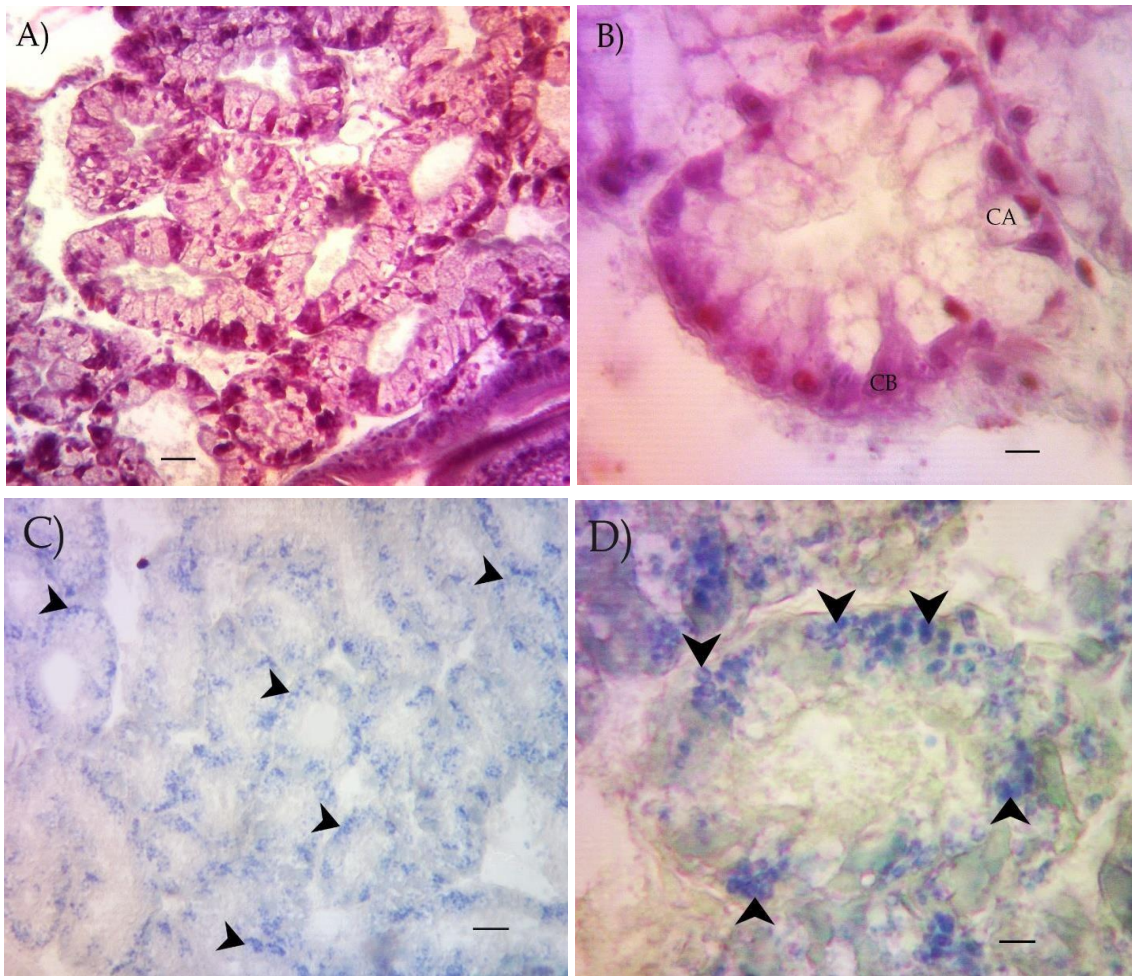


Figura 22: Corte transversal de glándula digestiva de *M. edulis* extraído de Puerto de San Antonio Este. A) Aspecto general con túbulos digestivos. B) Detalle de un túbulo en el cual se observan numerosas células basófilas triangulares (CB) y células absortivas vacuoladas (CA). C) Aspecto general de glándula digestiva. Las puntas de flecha señalan los gránulos de lipofuscinas.

D) Detalle de túbulo con nmerosos gránulos de lipofuscinas marcados con puntas de flecha. A) y B) Coloración tricrómico de Masson modificado. C) y D) Azul de Nilo de Lillie, Barra = A) y C) 20 μ m, B) y D) 5 μ m.

La Figura 13 corresponde al aspecto general de la branquia de un mejillón capturado de PE. En la Figura 13B se observa un engrosamiento del epitelio de la zona sublateral. Además, se encontraron numerosas infiltraciones de hemocitos en el vaso hemolinfático (Figuras 13C, 14C) de algunos filamentos y de la unión interlaminillar (Figuras 13B, 14A, 16B, 18B, 20A y C). En ocasiones se encontraron

filamentos fusionados en la zona frontal y con alta frecuencia dilatación de la luz del vaso hemolinfático (Figura 14B, 16B y 18C). Se observó un adelgazamiento del epitelio de la zona abfrontal (Figuras 13C, 16B, 18B y 20C). Las alteraciones descritas no fueron observadas en las branquias de los individuos de la isla.

No se encontraron granulocitomas en ninguno de los órganos analizados de ningún individuo. Tampoco se detectaron rastros de parasitosis ni de infecciones de ningún tipo.

El otro órgano que se analizó fue la glándula digestiva. Para el caso de mejillones de IM, la glándula digestiva está constituida por ciegos con luz estrellada y epitelio cilíndrico formado por células digestivas vacuoladas y escasas células basófilas (Figura 21 A y B). En el caso de mejillones de PE, se observó una luz dilatada ocupada por secreción y restos celulares; se observó un adelgazamiento del epitelio de los ciegos y numerosas células basófilas (Figura 22 A y B). No se observaron gránulos de lipofuscinas con la técnica de Schmorl, a pesar de haber agregado un control positivo como la glándula digestiva de otro mejillón, *Diplodon chilensis* (Rochetta *et al.*, 2014), por lo que se procedió a buscar una técnica alternativa. Se probó entonces la técnica de azul de Nilo sulfúrico de Lillie. Resultados preliminares mostraron marcas positivas en glándula digestiva (Figura 21C y D). Las marcas se obtuvieron en las células que tapizan los túbulos ciegos de las glándulas digestivas. Se observaron más cantidad de gránulos de color azul en los mejillones del puerto (Figura 22B y C). Las figuras 19,17 y 15 fueron tomadas como control.

3.6.2 Análisis morfométrico

Las mediciones del espesor del epitelio branquial en cuatro zonas del filamento se muestran en la Tabla 3. Se incluye el largo de los filamentos branquiales medidos.

		IM		PE	
		julio 2016	marzo 2017	julio 2016	marzo 2017
Zona	Frontal	14,3 ± 1,2	10,6 ± 0,7	12,1 ± 1,2	10,0 ± 0,7
	Lateral	11,4 ± 1,6	8,7 ± 0,7	10,1 ± 0,8	9,1 ± 1,2
	Sublateral	1,9 ± 0,3	1,7 ± 0,3	3,1 ± 0,5	3,3 ± 0,5
	Abfrontal	13,8 ± 1,5	10,7 ± 0,9	8,5 ± 1,7	8,1 ± 1,4
Filamento	Largo	187 ± 42 ^a	123 ± 5 ^b	136 ± 18 ^b	115 ± 7 ^b

Tabla 3. Altura del epitelio branquial en cuatro zonas del filamento y largo de los filamentos braquiales de *M. edulis* de Isla Mejillón (IM) y de Puerto del Este (PE) capturados en julio 2016 y en marzo 2017. Los valores (en μm) se expresan como promedio \pm desvío estándar ($n = 5$). Sólo se muestra el ANOVA para el largo de los filamentos; las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Debido a que se observó una dependencia de la altura del epitelio con el largo del filamento y como en esta última variable el ANOVA mostró diferencias significativas, se decidió utilizarla para normalizar (relativizar) las mediciones de las alturas del epitelio branquial en cada zona.

La altura relativizada del epitelio branquial en la zona frontal permaneció invariable al comparar sitios o épocas de muestreo ($p > 0,05$) (Figura 23A). En cambio, la altura del epitelio de la zona lateral mostró un incremento significativo al comparar PE con IM (Figura 23B). De manera similar, la altura del epitelio branquial de la zona sublateral fue mayor en los animales provenientes de PE, con un marcado incremento en marzo 2017 (Figura 23C). Para la zona abfrontal, se observó una disminución en la altura del epitelio branquial de animales colectados en PE (Figura 23D).

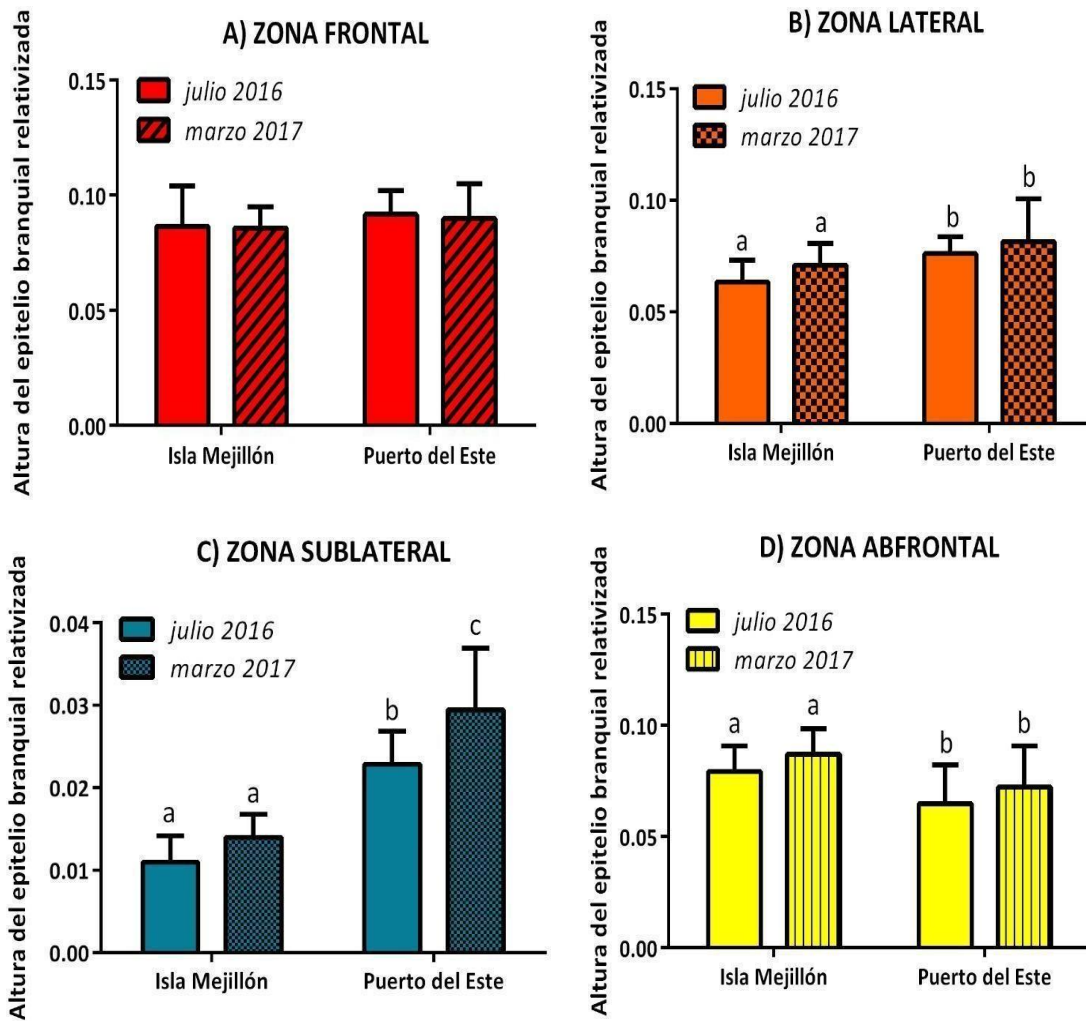


Figura 23: Altura del epitelio branquial relativizada al largo del filamento. Se tomaron mediciones en cuatro zonas del filamento branquial de *M. edulis* capturados en julio 2016 y en marzo 2017 tanto de Isla Mejillón como de Puerto del Este. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4. DISCUSIÓN

4.1. Contenido de metal

4.1.1. Concentración de metales en el agua

La presencia de metales en los ambientes costeros patagónicos está generalmente asociada a la descarga de efluentes urbanos e industriales y a las actividades portuarias (Commendatore y Esteves, 2007; Massara Paletto *et al.*, 2008; Di Salvatore *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2018). En la zona de la Bahía San Antonio, en el Golfo San Matías, los primeros estudios ambientales comenzaron a realizarse en los años 90 estudiando los efectos de la actividad minera que se realizó por más de 20 años (1960 - 1984) (Vázquez *et al.*, 2007). Los estudios sobre el contenido de metales han sido realizados mayoritariamente en sedimentos de la zona marino-costera con una actividad portuaria de relativa importancia desde el año 1983, que en el caso de nuestro trabajo refiere al sitio Puerto del Este (PE) (Gil *et al.*, 1988; Vázquez *et al.*, 2007; Marinho *et al.*, 2018). Sin embargo, la información sobre la concentración de metales en el agua es prácticamente inexistente (Sartor, 2016). Como era esperable, los valores de las concentraciones de los cuatro metales analizados fueron mayores en el sitio portuario; en particular, cromo, níquel y zinc fueron significativamente mayores que los de Isla Mejillón (IM), sitio de referencia por su bajo impacto antropogénico.

Resultó dificultoso encontrar valores de referencia de metales traza en agua de mar con los cuales comparar nuestros resultados, para analizar si superaban el límite permitido. En nuestro país, hace más de 25 años, se promulgó la Ley N° 24.051 que especifica los niveles guía de calidad ambiental, reglamenta lo relativo a residuos peligrosos generados por las industrias y sugiere concentraciones máximas de productos químicos y metales en distintos tipos de aguas para considerarlas peligrosas. Para Brasil se encontró también una resolución del Consejo Nacional del Medio Ambiente (CONAMA 2005) en la que se establecen los valores para la buena calidad del agua de mar en la resolución 357, cuyos

valores máximos permitidos son incluso mayores que los mencionados para la ley argentina.

Para los metales analizados las concentraciones máximas permitidas por las leyes argentina y brasilera para el cuidado de la vida acuática en aguas saladas superficiales son las detalladas en la Tabla 4. De todos los metales medidos en agua, el zinc en ambas temporadas de PE (y en marzo 2017 para IM) supera las concentraciones permitidas para la ley argentina pero no para la resolución brasilera. Si bien el zinc es un metal esencial, su exceso se asocia a un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes y peroxidación lipídica en los organismos acuáticos (Duarte *et al.*, 2011).

Metal	Ley 24.051	CONAMA
Cobre	4	5
Cromo (VI)	18	-
Cromo total	-	50
Zinc	0,2	90
Níquel	7,1	25

Tabla 4: Concentraciones máximas permitidas (en µg/L) de metales en agua salada según ley argentina N° 24.051 y resolución de CONAMA 2015 en Brasil.

El cromo presenta su máxima peligrosidad en su estado de oxidación VI más que en estado III, causando toxicidad en el ADN y por consiguiente problemas celulares y carcinogénesis (Walsh y O'Halloran, 1997). En nuestro trabajo se midió cromo total (donde está incluida la fracción con estado de oxidación VI), con valores menores a los permitidos por ley, por lo que podemos deducir que la concentración de Cr⁺⁶ sería aún menor. De todos modos, los valores de cromo y níquel de las aguas de PE registraron concentraciones significativamente mayores a las de IM, con lo que su presencia combinada podría causar impacto

en la fauna acuática. Con respecto al cobre, los valores medidos fueron inferiores al valor del blanco de reactivos, con excepción de marzo 2017 en PE, por lo que este metal también podría afectar.

4.1.2. Concentración de metales en *M. edulis*

Los invertebrados acuáticos acumulan metales trazas en sus órganos, ya sean o no esenciales para su metabolismo. La concentración de metal que se puede encontrar en los organismos va a depender de la concentración de metal biodisponible, como así también del equilibrio entre la absorción y la excreción del metal (Ying *et al.*, 1993). Distintos individuos que habitan en un mismo sitio acumularán diferentes concentraciones de metales (Eisler, 1981). La concentración del metal acumulado no puede ser evaluada en una escala absoluta (alta o baja) debido a que la concentración de metal acumulado dependerá del órgano y/o del organismo implicado (Rainbow, 1990).

Además, como la concentración de las proteínas totales varían entre los distintos órganos por sus diferencias estructurales y funcionales y la mayoría de los metales se unen a distintas proteínas, es muy probable que la bioacumulación sea diferencial únicamente por las diferencias en la concentración de proteínas sin poder evaluar otros factores (Halliwell y Gutteridge, 2015) por lo cual no resultaría adecuado comparar las concentraciones bioacumuladas de metales entre órganos.

Los mejillones filtran volúmenes relativamente importantes de agua que les permiten alimentarse e intercambiar gases y así captan metales del medio que pueden acumular en sus tejidos (Attig *et al.*, 2010; Ciacci *et al.*, 2012). A partir de los resultados obtenidos, se observa que las branquias y la glándula digestiva de los mejillones obtenidos de PE acumularon mayores concentraciones de cobre y cromo que los de IM, coincidiendo en este último caso con el aumento del metal en el agua de ese lugar. Diferentes autores observaron que para algunos metales la bioacumulación en la mayoría de los órganos es proporcional a la

concentración del metal en agua (Janssen y Scholz, 1979; George y Pirie, 1980; Attig *et al.*, 2010). Nuestros resultados reafirman estas investigaciones puesto que, a mayor concentración de cobre y cromo en el agua, mayor su bioacumulación en *M. edulis*. En el caso del manto, la concentración de cromo varió únicamente entre temporadas y no entre sitios pudiendo esto tener relación quizás con otros factores como la solubilidad del metal o tal vez la asociación del mismo con compuestos orgánicos disueltos que se saben que aumentan su ingreso a los distintos órganos y membranas (Walsh y O'Halloran, 1997). Se debe tener en cuenta que las gónadas se desarrollan en el manto. El grado de madurez y desarrollo gonadal de *M. edulis* sigue un ciclo anual con maduración y evacuación de gametas entre mediados de primavera y fines de verano (Sar *et al.*, 2018).

El cobre y el zinc por su parte, son metales esenciales para el metabolismo de los organismos -no únicamente los acuáticos- por lo que es esperable su bioacumulación (Santos *et al.*, 2014). Esta situación se condice con los resultados obtenidos para el cobre, no detectado en la mayoría de los lugares muestreados, pero si detectado en los órganos y notoriamente aumentado en los tres órganos de mejillones de PE. La retención del cobre en el mejillón promueve su unión al sitio activo de la hemocianina que facilita el transporte de oxígeno en la hemolinfa de los moluscos (Markl, 2013).

La concentración de níquel en los distintos órganos fue constante independientemente del sitio o de la época de muestreo, aunque se encontró un aumento significativo en agua de PE. Esto indicaría que las diferencias en la concentración de níquel en el agua no serían lo suficientemente importantes para afectar una diferente incorporación en los órganos analizados. Algunos estudios sugieren que el níquel se metabolizaría de manera similar al cobre en *Mytilus* sp., causando el mismo tipo de alteraciones oxidativas (Attig *et al.*, 2010).

Se puede observar también en un sentido más amplio, que la branquia y la glándula digestiva se comportan de forma similar respecto a la absorción de los metales, mientras que en el manto hay algunas diferencias en las concentraciones

entre los sitios y entre las temporadas. Esto podría explicarse, por un lado, porque las branquias participan en la filtración, selección y transporte de partículas alimenticias (Beninger *et al.*, 1993) y la glándula digestiva es responsable de la digestión intracelular, absorción y metabolismo de los distintos elementos químicos (Thompson *et al.*, 1974). Se señala a la glándula digestiva como el sitio principal de bioacumulación de metales y detoxificación (Janssen y Scholz, 1979; Walsh y O'Halloran, 1997; Attig *et al.*, 2010). Es importante destacar que ambos órganos están en contacto directo por tiempo prolongado con mayor cantidad de partículas y sustancias disueltas que el manto, además este último tiene una función asociada a la reproducción como se mencionara previamente (Sar *et al.*, 2018).

4.2. Balance oxidativo en *M. edulis*

Los biomarcadores son respuestas mensurables a distintos niveles de organización biológica como ser molecular, bioquímico o celular, que reflejan la exposición a contaminantes o cambios en el medioambiente (Noreña-Barroso *et al.*, 2004) y son ampliamente utilizados en programas de biomonitoreo (Roméo *et al.*, 2005; Kimbrough *et al.*, 2008). En el caso de los organismos acuáticos los parámetros de estrés oxidativo se utilizan para evaluar el daño causado por metales y xenobióticos (van der Oost *et al.*, 2003; Lesser, 2006; Lushchak, 2011; Regoli *et al.*, 2014). Distintas investigaciones han probado que los moluscos bivalvos son excelentes bioindicadores demostrando la inducción de estrés oxidativo por exposición a metales trazas tanto en condiciones de campo (Di Salvatore *et al.*, 2013; El Khodary *et al.*, 2018) como de laboratorio (Viarengo *et al.*, 1990; Sabatini *et al.*, 2011).

4.2.1. Defensas antioxidantes

Es sabido que la mayoría de los metales de transición pueden generar especies reactivas del oxígeno (EROs) mediante la reacción de Fenton (Goldstein

et al., 1993; Stohs y Bagchi, 1995; Livingstone, 2001), y que los organismos cuentan con mecanismos celulares para hacer frente a estas que les permiten la supervivencia en condiciones ambientales desfavorables (Sheehan y Power 1999; Valavanidis *et al.*, 2006). La detoxificación celular se divide, según varios autores, en al menos dos fases: Fase I y II. En la primera se realiza la oxidación de los xenobióticos que ingresaron a la célula, la captura de radicales libres formados allí por los mismos. Estas funciones suelen estar mediadas por citocromos, flavinas y otros compuestos de bajo peso molecular entre los cuales se encuentran el glutatión reducido (GSH) y algunas vitaminas. En la segunda fase se conjugan y tratan los productos formados en esta primera etapa para obtener xenobióticos más hidrosolubles para su excreción, conjugando estos compuestos con glucurónidos, grupos sulfato o GSH (Ishikawa, 1992; Lushchak, 2011). El tripéptido glutatión (GSH) está formado por glutamato, cisteína y glicina, y compone una fracción grande de la primera fase de la detoxificación y defensa antioxidante celular, ya que atrapa por sí mismo una cantidad enorme de radicales libres celulares y en segundo lugar interviene en la reducción del H_2O_2 además de ser sustrato de enzimas antioxidantes (Hayes y McLellan, 1999). El GSH suele estar en una concentración por encima de los $10 \mu M$ en la célula creando un ambiente reductor, previniendo con ello los daños que pueden causar las condiciones de estrés oxidativo (Hayes y McLellan, 1999; Lesser, 2006). Es por esto que el GSH es uno de los compuestos preferidos para estudiar las condiciones oxidativas y la capacidad de detoxificación de las células y los órganos (Lushchak, 2011).

Los metales traza son capaces de generar radicales libres y por lo tanto pueden disminuir los niveles celulares de GSH (Ercal *et al.*, 2001; Lesser, 2006). La disminución en la concentración de esta molécula puede suceder por diversos mecanismos: (a) los metales aumentan el número de radicales libres en la célula que son captados por el GSH (Ercal *et al.*, 2001) (b) este tripéptido se une directamente con estos metales de transición y los captura (Viarengo, 1985) (c) el aumento de la actividad de las enzimas que se encargan de las defensas

antioxidantes como por ejemplo la Glutation-S-transferasa y la glutatión peroxidasa que lo utilizan como sustrato o cofactor (Regoli *et al.*, 1998). En nuestro estudio el análisis de los niveles de GSH en los distintos órganos de *M. edulis* mostró diferentes respuestas en función de los sitios y las temporadas estudiadas. El GSH del manto permaneció invariable. En cambio, en la branquia se observó una disminución significativa de GSH en verano, pero no hubo variación entre sitios. Una posible explicación podría ser el aumento en la actividad metabólica asociada al aumento en la temperatura ambiental, con una consecuente reducción en los niveles de GSH, como se reportó para el mejillón marrón *Perna perna* (Wilhelm Filho *et al.*, 2001). En glándula digestiva se observan diferencias tanto por sitio como por temporada, siendo menores las concentraciones de GSH en PE y en verano. La alta afinidad hacia los metales de este tripéptido provocaría su disminución, como se vio en otros moluscos bivalvos expuestos a metales (Corazza *et al.*, 1996; Canesi *et al.*, 1999; Ruíz *et al.*, 2018). Para corroborar las hipótesis deberían hacerse muestreos sucesivos y análisis en distintas temporadas.

La glutatión-S-transferasa (GST) es una enzima que se encuentra en la mayoría de los organismos eucariotas, es ubicua en el citosol y trabaja en la fase II del proceso de detoxificación. Cataliza la conjugación de una variedad enorme de xenobióticos con su sustrato endógeno el GSH al cual oxida. Se observó, en estudios previos, que la actividad de GST aumenta en bivalvos de sitios contaminados, sin mostrar variaciones entre épocas del año ni debidas al sexo de los individuos (Sheenan *et al.*, 1991; Sabatini *et al.*, 2011; Di Salvatore *et al.*, 2013). Nuestros resultados muestran un aumento significativo de GST de manto (que bioacumula cobre y zinc) en los organismos del puerto. Por su parte, en branquias y glándula digestiva no se observaron diferencias significativas entre los sitios ni entre temporadas, lo que indica una respuesta diferencial de la enzima GST frente a la exposición a metales trazas entre los distintos órganos analizados. En el mejillón *M. galloprovincialis* el cobre aumenta en la actividad GST en glándula digestiva y en branquias (Canesi *et al.*, 1999). A partir de este

resultado podemos hipotetizar que las concentraciones de metales acumuladas en glándula digestiva y branquias de *M. edulis*, no serían suficientes para promover un aumento de la actividad GST, pero sí para provocar su aumento en manto.

Nuestros resultados podrían estar indicando además una diferencia específica de esta población *M. edulis* respecto a la estacionalidad en el metabolismo del GSH en branquia y glándula digestiva, ya que según Manduzio *et al.*, (2004) ambos órganos mostraron diferencias significativas entre temporadas en la actividad GST pero no para el GSH, opuesto a lo que obtuvimos. Autores como Bignell *et al.* (2011) postulan que no todas las poblaciones analizadas tienen las mismas características reproductivas y fisiológicas debido a la existencia de híbridos en las poblaciones que hacen que difieran tanto las respuestas de las actividades enzimáticas como las evaluadas en la histopatología, lo cual podría explicar la variabilidad tanto de nuestros propios resultados en ambos sitios como de las diferencias encontradas en la bibliografía.

En nuestro estudio se observó que los metales se bioacumulaban más en los distintos órganos de los animales del puerto y se encontró también una variación de ciertas defensas antioxidantes en los órganos. Para contar de forma correcta con estos organismos como bioindicadores es necesario tener en cuenta que las respuestas biológicas pueden mostrar variaciones que se relacionan no únicamente con el tipo de contaminante sino también con diferencias estacionales (conocidas o no), con la edad de los animales, con fluctuaciones fisiológicas o ambientales, así como también interacciones no estudiadas entre los distintos componentes presentes en el agua y absorbidos por el organismo. En nuestro caso, los individuos de ambos sitios presentaron tallas similares, por lo que se presume que poseen edades parecidas. La temperatura ambiental entre sitios para una misma época fue similar. Resulta fundamental en los programas de biomonitoreo minimizar las fuentes de variación al momento del análisis de los parámetros metabólicos de los organismos como respuesta a xenobióticos (Kimbrough *et al.*, 2008).

4.2.2. Daño oxidativo

Uno de los principales daños de las EROs es el producido en los ácidos grasos poli-insaturados, dando como consecuencia lipoperóxidos. Las principales estructuras que se ven afectadas son las membranas celulares y de organelas (Lesser, 2006). Los daños pueden llevar a problemas de fluidez de la membrana plasmática y por consiguiente a la muerte celular (Cadenas y Sies 1998). Por ser las primeras moléculas en recibir daño oxidativo, el análisis de la oxidación de los lípidos es una de las herramientas más utilizadas para cuantificar el daño oxidativo en los organismos acuáticos (Cadenas *et al.*, 1996; Géret *et al.*, 2002; Lushchak, 2011) Se ha observado con anterioridad que algunas especies de *Mytilus* sufrieron aumento en la peroxidación lipídica por metales (Viarengo *et al.*, 1990; Duarte *al.*, 2011). En otros estudios realizados en la cholga *Aulacomya atra* (Di Salvatore *et al.*, 2013), se observó peroxidación lipídica en los animales provenientes de áreas portuarias. En concordancia con estos estudios, en nuestra investigación detectamos aumento de peroxidación lipídica en los tres órganos de animales provenientes del puerto. Además de los metales, la presencia de compuestos orgánicos e hidrocarburos en zonas cercanas a las evaluadas podrían afectar el desbalance oxidativo promoviendo el daño oxidativo a lípidos (Commendatore *et al.*, 1996). Por su parte, otros estudios como los de Viarengo *et al.* (1990) y Ruíz *et al.* (2018) demuestran que en algunas situaciones las defensas antioxidantes de bivalvos son capaces de contrarrestar el daño oxidativo a los lípidos.

4.3. Alteraciones histológicas en *M. edulis*

El monitoreo de las concentraciones de metales en agua y en sedimentos no es suficiente para conocer los efectos adversos que estos producen sobre la biota. Para corroborar realmente el daño producido en los organismos acuáticos, la histopatología y particularmente la de los mejillones del género *Mytilus*, ha sido ampliamente utilizada, junto con los parámetros de estrés oxidativo, como

bioindicadores de las condiciones ambientales de distintas partes del mundo (Auffret, 1988; Bignell *et al.*, 2011).

Se ha reportado gran acumulación de hemocitos en los vasos de los filamentos branquiales y en glándula digestiva. Se sabe por investigaciones anteriores que estas alteraciones están correlacionadas con las cercanías a lugares contaminados con productos industriales (Svårdh y Johannesson, 2002; Nogarol *et al.*, 2016). Nosotros encontramos infiltración hemocitaria en los vasos hemolinfáticos de los filamentos branquiales de mejillones de la zona portuaria y en algunos casos además acompañadas con dilatación de los vasos.

Otro tipo de daño que puede observarse en los filamentos de las branquias expuestas a distintos contaminantes son fusiones de los filamentos, distensión de las células, dilatación del espacio intercelular, edemas y pérdidas de la integridad del filamento (Bignell *et al.*, 2011; Nogarol *et al.*, 2016). En nuestro estudio encontramos filamentos fusionados por la zona frontal únicamente en los animales provenientes del puerto, fusiones en otras zonas del filamento fueron citadas por otros autores para mejillones afectados por diversos contaminantes (Sunila, 1987; Domouhtsidou y Dimitriadis, 2000; Varotto *et al.*, 2013; Nogarol *et al.*, 2016). Existen estudios que indican que no hacen falta concentraciones letales de los metales en el agua para que se vean este tipo de lesiones y malformaciones tisulares (Attig *et al.*, 2010; Sheir *et al.*, 2013). Entonces los daños histológicos hallados en la presente tesis probablemente estén causados por la exposición a contaminantes.

Otro tipo de alteración tisular frecuente es la aparición de granulocitomas. Los estudios describen y muestran que son agregados de hemocitos granulares que se acumulan en glándula digestiva y manto de bivalvos, los cuales pueden verse en varios estados de degeneración celular rodeados o no de una capa de colágeno (Lowe y Moore, 1979). Los hemocitos granulares o granulocitos fagocitan bacterias, virus, protozoos y restos celulares (Goslin, 2003). También se han reportado granulocitomas en animales expuestos a contaminantes

industriales (Lowe y Moore, 1979; Neff *et al.*, 1987; Svårdh, 1999). En este trabajo, no se encontraron granulocitomas en los órganos estudiados, lo que no se descarta que pueda deberse al bajo número de individuos estudiados y/o a que hay partes del manto (que contiene la gónada) cuyo análisis está pendiente. De todas maneras, se ha reportado que no se han encontrado granulocitomas con al menos 30 ejemplares muestreados (Bignell *et al.*, 2011), lo que quizás tenga que ver con otras cuestiones que desconocemos, cómo ser más específicamente el tipo de contaminantes -si son metales, hidrocarburos u otros materiales orgánicos- en esas aguas y las concentraciones de los mismos (Neff *et al.*, 1987).

Un bioindicador de estrés oxidativo que se puede utilizar en histología es la presencia de lipofuscinas, que son derivados de la oxidación incompleta de proteínas y lípidos acumulados a lo largo de la vida de la célula y que no pueden ser degradados por los lisosomas (Terman y Blunk, 2004). Trabajos previos utilizan la técnica de Schmorl para la detección de lipofuscinas en diferentes órganos de mejillones (Rocchetta *et al.*, 2014). Esta técnica se basa en la reducción del ferricianuro en ferrocianuro con la formación de un complejo de hierro azul oscuro. Lamentablemente, no hemos obtenido resultado con esta técnica, es posible que algún reactivo haya fallado o debemos modificar el protocolo. Otra técnica alternativa es la de azul de Nilo que colorea lisosomas terciarios que contienen las lipofuscinas en momentos más avanzados del proceso (Auffret, 1988). Una técnica más específica que diferencia melanina (verde) de lipofuscina (azul) es la de azul de Nilo sulfúrico de Lillie (Lillie, 1956) que resultó adecuada para marcar lisosomas con lipofuscinas (Auffret, 1988). Esta técnica fue utilizada en reemplazo de la anterior mencionada y se puede observar en las fotos de glándula digestiva de *M. edulis* que presentan exclusivamente gránulos de lipofuscina de color azul. Si bien aún no se realizó una cuantificación, se observan mayor cantidad de gránulos de color azul más intenso en mejillones de PE comparado con los de IM, sugiriendo un incremento en el contenido de lipofuscinas por estrés oxidativo como se observó en otros mejillones (Mathew y Damodaran, 1997; Rocchetta *et al.*, 2014). Lowe y Clarke (1989) mencionan un

aumento en células basófilas en glándula digestiva, similar a lo observado por nosotros. Este aumento mencionado permitiría la reposición por células precursoras en etapa de diferenciación hacia células digestivas. Por otra parte, esos mismos autores encuentran reducción del espesor del epitelio de los ciegos digestivos y autofagia causada por cobre y derivados de diésel, por lo cual sería interesante realizar morfometría de la glándula digestiva de *M. edulis*.

4. 4. Análisis morfométrico

El análisis morfométrico es otra de las herramientas utilizadas para evaluar el daño en las células y tejidos por la exposición de organismos acuáticos a xenobióticos (Sicko-Goad, 1982; Calisi *et al.*, 2008). En el caso de las distintas especies de *Mytilus*, específicamente, también han sido utilizadas para evaluar el efecto de metales (Hietanen *et al.*, 1988) y de contaminantes urbanos e industriales en los organismos (Da Ros *et al.*, 2000).

En nuestro trabajo, se midió la altura del epitelio en cuatro zonas morfofuncionalmente distintas de los filamentos branquiales, obteniéndose diferencias significativas entre el sitio de referencia y el sitio con mayor impacto antrópico. El único epitelio cuya altura permaneció constante fue el de la zona frontal, responsable del transporte de partículas alimenticias hacia la boca (Owen, 1974; Nogarol *et al.*, 2012). Del resto de las zonas, tanto la lateral que genera el flujo de agua que favorece la filtración (Dufour y Beninger, 2001) como la zona sublateral que realiza el intercambio gaseoso (Wright *et al.*, 1987), mostraron epitelios engrosados en los animales del puerto, por lo que se deduce que la filtración y la captación/excreción de gases se verán afectadas. El engrosamiento del epitelio respiratorio enlentecería la difusión de los gases respiratorios (Randall *et al.*, 2001). Para corroborar esta hipótesis se podría estudiar la captación de oxígeno de *M. edulis* expuesto a metales en experimentos controlados (Brown y Newell, 1972). Por otro lado, la tasa de filtración y movimiento de partículas podría estudiarse por endoscopía como se menciona en Beninger y St Jean (1997).

El epitelio abfrontal, que es el encargado de colaborar con el bombeo del agua y además permite la lubricación y limpieza de las branquias (Jones *et al.*, 1990; Dufour & Beninger, 2001), resultó adelgazado en los mejillones de la zona del puerto. Según Hietanen *et al.* (1988) la intoxicación por zinc estaría provocando un vaciamiento del mucus de la zona abfrontal, que explicaría lo observado por nosotros. Para evaluar si se ven afectadas estas funciones resultaría interesante analizar el tipo del mucus, ya que el aumento en la acidez del mucus está asociado a la viscosidad que permite la lubricación (Beninger *et al.*, 1993). Debido a que encontramos mucocitos con distinto tipo de glicoconjugados en esta zona, sería útil poder cuantificar la cantidad y tamaño de los distintos mucocitos de este sector como lo hicieron Dufour y Beninger (2001).

Algunos autores como Domouhtsidou y Dimitriadis (2000) y Varotto *et al.* (2013) que estudiaron la exposición simultánea de varios metales en *M. galloprovincialis* observaron que las células de la zona frontal y abfrontal son las que más absorben y forman depósitos de metales traza en su interior, esto también sucede en las células de la glándula digestiva. Estos autores encontraron fusiones de filamentos y deformaciones celulares. En el trabajo de Hietanen *et al.* (1988) la intoxicación por zinc estaría provocando inflamación de la zona sublateral y aumento del volumen de los vasos, aunque no se descarta el desbalance osmótico, ya que el metal podría estar afectando el intercambio iónico de *M. edulis* en agua salobre. Siendo que concentraciones de zinc en agua medidas en esta tesis son superiores a los niveles guía permitidos y además son mayores en el puerto comparando el año 2017, suponemos que podría ser una de los causantes de las alteraciones observadas en los filamentos branquiales de *M. edulis*.

Según Marigomez *et al.* (2002) la incorporación de metales traza en las células de moluscos se realiza por varios mecanismos, como ser: (a) difusión pasiva (b) difusión facilitada, (c) transporte activo dependiente de energía (por proteínas de membrana con especificidad amplia o proteínas intrínsecas de membrana selectivas) y (d) endocitosis, como por ejemplo el hierro que ingresa a células

branquiales por pinocitosis, o el metal particulado que ingresa a células digestivas. En ambos casos, los metales se incorporan a lisosomas, se acumulan y luego se exocitan para ser transportados a otros tejidos vía hemocitos. En este trabajo también señalan que las distintas zonas del filamento incorporan diferentes metales, por ejemplo, el cobre se localiza principalmente en la parte frontal y abfrontal y el zinc se observó en la transición de la zona lateral a la sublateral y en la zona abfrontal (Figura 24).

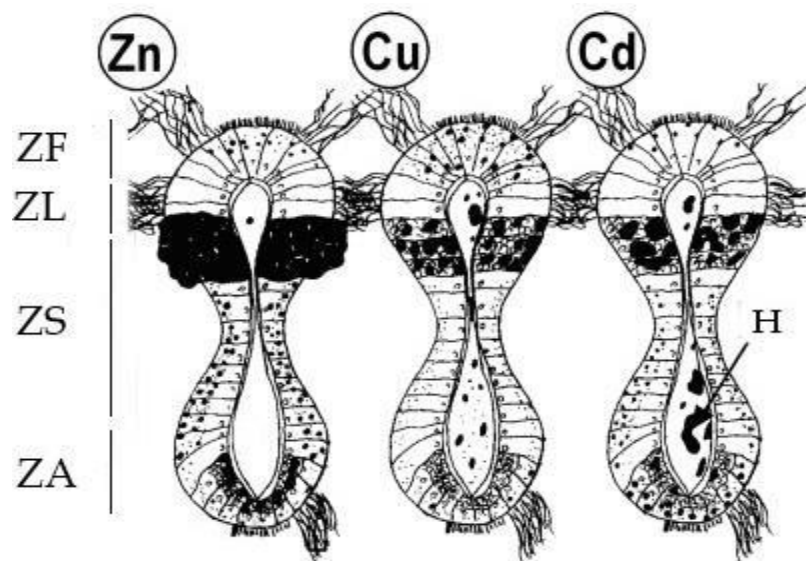


Figura 24: Esquema que muestra la acumulación diferencial de metales zinc (Zn) cobre (Cu) y cadmio (Cd) en tres filamentos branquiales de *M. edulis*. ZA: zona abfrontal, ZF: zona frontal, ZL: zona lateral, ZS: zona sublateral. H: hemocitos. Modificado de Marigómez *et al.*, (2002).

Esto nos ilumina más sobre lo encontrado en nuestro trabajo ya que podría explicar, en primer lugar, el engrosamiento del epitelio de las zonas lateral y sublateral por acumulación de zinc y, en segundo lugar, la infiltración hemocitaria en branquias de los animales del sitio con mayor impacto antrópico, que favorecería el transporte de los metales hacia otros órganos. Una vez que los metales ingresan a las distintas células, se pueden unir a una variedad de ligandos que influirán en la tasa de acumulación de ese metal. Su tratamiento

posterior dependerá de la cantidad de defensas antioxidantes y/o de la cantidad de metalotioneínas, que son proteínas que se unen específicamente a metales. Se propone para un futuro cercano medir la compartimentalización celular de los metales y la presencia y distribución tisular de metalotioneínas en los distintos órganos de *M. edulis* de los sitios estudiados.

5. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados surgidos en este trabajo de tesis aportan evidencias de la existencia de metales (cobre, cromo, níquel y zinc) en el agua del Golfo San Matías de la provincia de Río Negro. Las características físico-químicas del agua del sitio con mayor impacto antrópico explicarían las alteraciones histológicas encontradas en *M. edulis*, quién fue capaz de acumular metales en forma diferencial en los tres órganos analizados y responder con capacidades antioxidantes diferentes ante el efecto pro-oxidante causado por los contaminantes. En particular podemos concluir que:

- Los metales medidos en el agua como en los distintos órganos de *M. edulis* registraron mayores concentraciones en el sitio del puerto (Puerto del Este) en comparación con los de Isla Mejillón (sitio de referencia).
- El daño oxidativo a lípidos observado en branquia, glándula digestiva y manto indicaría una falta de eficiencia de los sistemas de defensa antioxidante para impedir efectos pro-oxidantes de los metales.
- La dilatación de los vasos hemolinfáticos con acumulación de hemocitos respondería a procesos inflamatorios con el consecuente transporte de metales que se bioacumulan en los distintos órganos.
- La alteración del espesor del epitelio branquial afectaría las múltiples funciones de este órgano, como ser la filtración del alimento y el intercambio gaseoso.
- Las alteraciones histopatológicas, junto con la determinación de parámetros de estrés oxidativo analizados en *M. edulis* resultan biomarcadores eficientes para analizar y cuantificar sitios impactados por metales como el Golfo San Matías.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ Aarab N, Godal BF, Bechmann RK. 2011. Mar. Environ. Res. 71(3), 213-217.
- ✓ Abele D, Brey T, Phillip E. 2009. Bivalve models of aging and the determination of molluscan lifespans. Exp. Gerontol. 44, 307-315.
- ✓ Alberts B, Bray D, Lewis J. 1994. Mol. Biol. cell, 3 ed. New York: Garland. Pub inc, 1161-1175.
- ✓ Anderson ME. 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Meth. Enzymol. 113, 548-553.
- ✓ Astorga MP, Cardenas L, Vargas J. 2015. Phylogenetic Approaches to Delimit Genetic Lineages of the *Mytilus* Complex of South America: How Many Species are there? J. Shell. Res. 34 (3), 919-930.
- ✓ Attig H, Dagnino A, Negri A, Jebali J, Boussetta H, Viarengo A, Dondero F, Banni M. 2010 . Uptake and biochemical responses of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to sublethal nickel concentrations. Ecotox. Environ. Saf. 73, 1712-1719.
- ✓ Auffret M. 1988. Histopathological changes related to chemical contamination in *Mytilus edulis* from field and experimental conditions Mar. Ecol. Prog. Ser. 46, 101-107.
- ✓ Beninger PG, St-Jean S, Poussart Y, Ward JE. 1993. Gill function and mucocyte distribution in *Placopecten magellanicus* and *Mytilus edulis* (Mollusca: Bivalvia): the role of mucus in particle transport. Mar. Ecol Prog. Ser. 98, 275-282.
- ✓ Beninger PG, St-Jean SD. 1997. The role of mucus in particle processing by suspension-feeding marine bivalves: unifying principles. Mar. Biol. 129, 389-397.
- ✓ Beuge JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. Meth. Enzymol. 52, 302-310.
- ✓ Bignell JP, Stentiford GD, Taylor NGH, Lyons BP. 2011. Histopathology of mussels (*Mytilus sp.*) from the Tamar estuary, UK. Mar. Environ. Res. 72, 25-32.
- ✓ Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. World All. Org. J. 5 (1), 9-19.

- ✓ Bocchetti R, Regoli F. 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* 65 (6), 913-921.
- ✓ Boelsterli UA. 2003. Mechanistic toxicology. Taylor and Francis, London and New York. 187-211.
- ✓ Borsa P, Rolland V, Daguin-Thiebaut C. 2011. Genetics and taxonomy of Chilean smooth-shelled mussels, *Mytilus* spp. (Bivalvia: Mytilidae). *Boston Soc. Nat. Hist.* 3 (1850) 343-348.
- ✓ Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- ✓ Brown BE, Newell RC. 1972. The effect of copper and zinc on the metabolism of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 16 (2), 108-118.
- ✓ Cadenas E, Sies H. 1998. The Lag Phase. *Free Rad. Res.* 28 (6), 601-609.
- ✓ Cadenas S, Lertsir S, Mikiotsuka M, Barja G, Miyazawa T. 1996. Phospholipid Hydroperoxides and Lipid Peroxidation in Liver and Plasma of ODS Rats Supplemented with α -Tocopherol and Ascorbic Acid. *Free Rad. Res.* 24(6), 485-493.
- ✓ Cajaraville MP, Marigómez I, Angulo E. 1993. Correlation between cellular and organismic responses to oil-induced environmental stress in mussels. *Sci. Tot. Environ.* 134, 1353-1371.
- ✓ Calisi A, Lionetto MG, Caricato R, Giordano ME, Schettino T. 2008. Morphometric alterations in *Mytilus galloprovincialis* granulocytes: a new biomarker. *Environ. Toxicol. Chem.* 27(6), 1435-1442.
- ✓ Canesi L, Viarengo A, Leonzio C, Filippelli M, Gallo G. 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicol.* 46, 67-76.
- ✓ Censi P, Spoto SE, Saiano F, Sprovieri M, Mazzola S, Nardone G. 2006. Heavy metals in coastal water systems. A case study from the northwestern Gulf of Thailand. *Chemosphere* 64, 1167-1176.

- ✓ Charmasson S, Barker E, Calmet D, Pruchon AS, Thebault H, 1999 Long-term variations of man-made radionuclide concentrations in a bio-indicator *Mytilus galloprovincialis* from the French Mediterranean coast. *Sci. Total Environ.* 237, 93-103.
- ✓ Ciacci C, Canonico B, Bilaničovã D, Fabbri R, Cortese K, Gallo G, Canesi L. 2012. Immunomodulation by Different Types of N-Oxides in the Hemocytes of the Marine Bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS ONE*, 7 (5), 369- 375.
- ✓ Commendatore M, Gil M, Harvey M, Colombo JC, Esteves, JL. 1996. Evaluación de la contaminación por hidrocarburos y metales en la zona costera patagónica. Fundación Patagonia Natural Chubut (Argentina) Plan de manejo integrado de la zona costera argentina. Chubut Argentina pp 47.
- ✓ Commendatore MG, Esteves JL. 2007. An Assessment of Oil Pollution in the Coastal Zone of Patagonia, Argentina. *Environ. Manag.* 40 (5), 814–821.
- ✓ CONAMA 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente/Ministério do Meio. Resolução No. 357 de 17 de março de 2005. <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3yano=2005>>.
- ✓ Conti ME, Stripeikis J, Finoia MG, Tudino MB. 2011. Baseline trace metals in bivalve molluscs from the Beagle Channel, Patagonia (Argentina). *Ecotoxicology* 20, 1341-1353.
- ✓ Conti ME, Stripeikis J, Finoia MG, Tudino MB. 2012. Baseline trace metals in gastropod mollusks from the Beagle Channel, Tierra del Fuego (Patagonia, Argentina). *Ecotox.* 21, 1112-1125.
- ✓ Corazza A, Harvey I, Sadler PJ. 1996. ¹H, ¹³C-NMR and X-ray Absorption Studies of Copper (I) Glutathione Complexes. *European J. Biochem.* 236 (2), 697–705.
- ✓ Da Ros L, Nasci C, Marigomez I, Soto M. 2000. Biomarkers and trace metals in the digestive gland of indigenous and transplanted mussels, *Mytilus galloprovincialis*, in Venice Lagoon, Italy. *Mar. Environ. Res.* 50 (1-5), 417-423.
- ✓ Di Salvatore P, Calcagno J, Ortiz N, Ríos de Molina MC, Sabatini SE. 2013. Effect of seasonality on oxidative stress responses and metal accumulation in soft

tissues of *Aulacomya atra*, a mussel from the South Atlantic Patagonian coast. Mar. Environ. Res. 92, 244-252.

✓ Dimitriadis VK, Domouhtsidou GP, Cajaraville MP. 2004. Cytochemical and histochemical aspects of the digestive gland cells of mussel *Mytilus galloprovincialis* (L.) in relation to functions. J. Mol. Histol. 35, 501-509.

✓ Domouhtsidou GP, Dimitriadis VK. 2000. Ultrastructural Localization of Heavy Metals (Hg, Ag, Pb, and Cu) in Gills and Digestive Gland of Mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.). Arch. Environ. Cont. Toxicol. 38(4), 472-478.

✓ Duarte CA, Giarratano E, Amin OA, Comoglio LI. 2011. Heavy metal concentrations and biomarkers of oxidative stress in native mussels (*Mytilus edulis chilensis*) from Beagle Channel coast (Tierra del Fuego, Argentina). Mar. Poll. Bull. 62(8), 1895-1904.

✓ Dufour SC, Beninger PG. 2001. A functional interpretation of cilia and mucocyte distributions on the abfrontal surface of bivalve gills. Mar. Biol. 138 (2) 295-309.

✓ Eisler J. 1981. Colecciones Galveston Bay Bibliography, GBIC Materials Available at Jack K. Williams Library. Trace metal concentrations in marine organisms.

✓ El Khodary GM, Radwan EH, El Ghazaly MM, El Bahnasawy D. 2018. Marine pollution by some heavy metals and physiological response of *Ruditapes decussates*. J. Biosci. Appl. Res. 4 (3), 199-217.

✓ Ercal BSP, Hande Gurer-Orhan BSP, Nukhet Aykin-Burns BSP. 2001. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal induced Oxidative Damage. Curr. Top. Med. Chem. 1 (6), 529-539.

✓ Esteves JL, Commendatore MG. 1993. Total aromatic hydrocarbons in water and sediment in a coastal zone of Patagonia, Argentina. Mar. Poll. Bull. 26 (6), 341-342.

✓ Fagan JM, Slecicka BG, Sohar I. 1999. Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. Int. J. Biochem. Cell Biol. 31 (7), 751-757.

✓ Farombi EO, Adelowo OA, Ajimoko YR. 2007. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African Cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. Int J. Environ. Res. Public

Health 4, 158-165.

- ✓ George SG, Pirie BSJ. 1980 .Metabolism of zinc in the mussel *Mytilus Edulis* (L.): a combined ultrastructural and biochemical study. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 60, 575-59.
- ✓ G eret F. 2002. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). Aqua. Living Res. 15 (1), 61–66.
- ✓ Gil MN, Harvey MA, Esteves JL. 1988. Metal content in bivalve molluscs from the San Jos e and Nuevo Gulfs, Patagonia, Argentina. Mar. Pollut. Bull. 19 (4), 181-182.
- ✓ Gilek, M, Tedengren M, Kautsky N. 1992. Physiological performance and general histology of the blue mussel, *Mytilus edulis L.*, from the Baltic and North seas. Netherlands J. Sea Res. 30, 11-21.
- ✓ Goldstein S, Meyerstein D, Czapski G. 1993. The Fenton reagents. Free Rad. Biol. Med. 15 (4), 435–445.
- ✓ Goslin E. 2003. Bivalve Molluscs, Biology Ecology and Culture. Fishing News Books.An imprint of Blackwell Science. A division of Blackwell Publishing.
- ✓ Gould AA. 1852. United States Exploring Expedition during the Years 1838, 1839, 1840, 1841, 1842: Mollusca y shells. Printed by Sherman P 1852. Philadelphia. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.10473>.
- ✓ Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249, 7130-7139
- ✓ Halliwell B, Gutteridge JMC. 2015. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press. Oxford, UK. First edition 1985, second edition 1989, third edition 1999, fifth edition 2015.
- ✓ Halliwell B. 2000. The antioxidant paradox. The Lancet 355, 1179-1184.
- ✓ Hayes JD, McLellan LI. 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. Free Rad. Res. 31 (4), 273-300.
- ✓ Hietanen B, Sunila I, Kristoffersson R. 1988. Toxic effects of zinc on the common mussel *Mytilus edulis L.* (*Bivalvia*) in brackish water. I. Physiological and histopathological studies. Ann. Zool. Fenn. 25 (4), 341-347.

- ✓ Hinton DE, Lauren D J. 1990. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes potential biomarkers of exposure. In: McCarthy, JF. Shugart, LR. (eds.) Biomarkers of environmental contamination. Lewis Publishers. Boca Raton, p. 17-57
- ✓ Ishikawa T. 1992. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. Trends Biochem. Sci. 17 (11), 463-468.
- ✓ Islam S, Tanaka M. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. Mar. Pollut. Bull. 48, 624-649.
- ✓ Janssen HH, Scholz N. 1979. Uptake and Cellular Distribution of Cadmium in *Mytilus edulis*. Mar. Biol. 55, 133-341
- ✓ Jones HD, Richards OG, Hutchinson S. 1990. The role of ctenial abfrontal cilia in water pumping in *Mytilus edulis* L. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 143, 15-26.
- ✓ Kachel MJ. 2008. Particularly Sensitive Sea Areas Threats to the Marine Environment: Pollution and Physical Damage. Hamburg Studies on Maritime Affairs, 23-36. Part of the Hamburg Studies on Maritime Affairs book series (HAMBURG, volume 13).
- ✓ Kell DB. 2009. Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. BMC Medical Genomics, 2 (2) doi:10.1186/1755-8794-2-2.
- ✓ Kimbrough KL, WE Johnson, GG Lauenstein, JD Christensen and DA Apeti. 2008. An Assessment of Two Decades of Contaminant Monitoring in the Nation's Coastal Zone. Silver Spring, MD. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 74. 105 pp.
- ✓ Krishnakumar PK, Casillas E, Varanasi U. 1994. Effect of environmental contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound, Washington, USA. I. Cytochemical measures of lysosomal responses in the digestive cells using automatic image analysis. Mar. Ecol. Prog. Ser. 106, 249-261.
- ✓ Lam PK, Gray JS. 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. Mar. Poll. Bull. 46 (2), 182-186.

✓ Lamarck JB. 1819. Histoire naturelle des animaux sans vertèbres présentant les caractères généraux et particuliers de ces animaux, leur distribution, leurs classes, leurs familles, leurs genres et la citation des principales espèces qui s'y rapportent, Tome sixième, Librairie Verdier, Paris, 232 pp. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.12712>

✓ Lesser MP. 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Ann. Rev. Physiol.* 68 (1), 253-278.

✓ Lillie RD. 1956. A Nile blue Staining Technic for the Differentiation of Melanin and Lipofuscins. *Stain Technology* 31(4), 151-153.

✓ Linnaeus CV. 1758. *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*, Tomus I, editio decima, reformata, Laurentii Salvii, Stockholm, 824 pp. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.542>.

✓ Livingstone DR. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Poll. Bull.* 42, 656-66.

✓ Lomovasky BJ, Morriconi E, Brey T, Calvo J. 2002. Individual age and connective tissue lipofuscin in the hard clam *Eurhomalea exalbida*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 276, 83-94.

✓ Lowe DM, Clarke KR. 1989. Contaminant-induced changes in the structure of the digestive epithelium of *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicol.* 15 (4), 345-358.

✓ Lowe DM, Moore MN. 1979. The cytology and occurrence of granulocytomas in mussels. *Mar. Poll. Bull.* 10 (5), 137-141.

✓ Luoma SN, Johns C, Fisher NS, Steinberg NA, Oremland RS, Reinfelder JR. 1992. Determination of selenium bioavailability to a benthic bivalve from particulate and solute pathways. *Environ. Sci. Technol.* 26, 485-491.

✓ Lushchak VI. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicol.* 101, 13-30.

✓ Lushchak OV, Rovenko BM, Gospodaryov DV, Lushchak VI. 2011. *Drosophila melanogaster* larvae fed by glucose and fructose demonstrate

difference in oxidative stress markers and antioxidant enzymes of adult flies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Moll. Int. Physiol.* 160 (1), 27-34.

✓ Manduzio H, Monsinjon T, Galap C, Leboulenger F, Rocher B. 2004. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat. Toxicol.* 70 (1), 83-93.

✓ Marigómez I, Soto M, Cajaraville MP, Angulo E, Giamberini L. 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Micr. Res. Tech.* 56 (5), 358-392.

✓ Marinho CH, Giarratano E, Gil MN. 2018. Metal biomonitoring in a Patagonian salt marsh. *Environ. Monit. Assess.* 190, 598-612.

✓ Markl J. 2013. Evolution of molluscan hemocyanin structures. *Bioch. et Bioph. Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1834 (9), 1840-1852.

✓ Martin TD, Brockhoff CA, Creed JT. 1994. Method 200.7: Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma-atomic Emission Spectrometry .U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, USA. Revision 4.4. 58 pp.

✓ Massara Paletto V, Commendatore MG, Esteves JL. 2008. Hydrocarbon levels in sediments and bivalve mollusks from Bahía Nueva (Patagonia, Argentina): An assessment of probable origin and bioaccumulation factors. *Mar. Poll. Bull.* 56 (12), 2100-2105.

✓ Mathew S, Damodaran R. 1997. Lipofuscin as physiological indicator of heavy metal stress in *Sunetta scripta* (yellow clam) and *Perna viridis* (green mussel) *Indian J. Mar. Sci.* 26 (1), 64-67.

✓ McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244 (22), 6049-6055.

✓ Millán D. 2003. Anuario de Estadísticas Pesqueras de la Provincia de Río Negro. Dpto. Policía de Pesca, Dirección de Pesca, 153 pp.

- ✓ Miller GG, Sweet LI, Adams JV, Omann GM, Passino-Reader D, Meter PG. 2002. In vitro toxicity and interactions of environmental contaminants (Arochlor 125 and mercury) and immunomodulatory agents (lipopolysaccharidae and cortisol) on thymocytes from lake trout (*Salvelinus namaycus*). Fish and Shellfish Immunol. 13, 11-26.
- ✓ Moore MN. 1990. Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. The Histochem. J. 22 (4), 187-191.
- ✓ Narvarte MA, Esteves JL, Gil MA, Vázquez NN. 2007. Monitoring Heavy Metal Pollution in San Antonio Bay, Río Negro, Argentina.
- ✓ Neff JM, Hillman RE, Carr RS, Buhl RL Lahey JI. 1987 Histopathologic and Biochemical Responses in Arctic Marine Bivalve Molluscs Exposed to Experimentally Spilled Oil. Arctic, Vol. 40, Supplement 1, pp. 220-229
- ✓ Nogarol LR, Brossi-Garcia AL, Bastão de Souza R, Fontanetti CS. 2016 Histopathological effects of the herbicide atrazine on gills of the Brazilian endemic bivalve *Diplodon expansus*, International Journal of Environmental. Anal. Chem. 96(4), 387-403,
- ✓ Nogarol LR, Brossi-Garcia AL, Oliveira David JA, Fontanetti CS. 2012. Morphological and histochemical characterization of gill. Filaments of the Brazilian endemic bivalve *Diplodon*. Microsc. Microanal. 18 (6) 1450-1458.
- ✓ Noreña-Barroso E, Simá-Álvarez R, Gold-Bouchot G, Zapata-Pérez O. 2004. Persistent organic pollutants and histological lesions in Mayan catfish *Ariopsis assimilis* from the Bay of Chetumal, Mexico. Mar. Poll. Bull., 48 (3-4), 263-269.
- ✓ Oropesa AL, Moreno JJ, Gómez LJ. 2017. Lesiones histopatológicas en peces originadas por la exposición a contaminantes emergentes: recopilando y analizando datos. Rev. Toxicol. 34, 99-108.
- ✓ Owen G. 1974. Studies on the Gill of *Mytilus edulis*: The Eu-Latero-Frontal Cirri. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 187 (1086), 83-91.

- ✓ Petrović S, Semenčić L, Ozretić B, Ozretić M. 2004. Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north adriatic coastal waters (Croatia). *Mar. Poll. Bull.* 49 (9-10), 713-720.
- ✓ Phillips DJH. 1995. The chemistries and environmental fates of trace metals and organochlorines in aquatic ecosystems. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 193-200.
- ✓ Rainbow PS. 1990. Heavy metal levels in marine invertebrates. En: Furness, R.W., Rainbow, P.S. (Eds.). *Heavy Metals in the Marine Environment*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 67-79.
- ✓ Randall D, Burggren W, French K. 2001. *Eckert Animal Physiology*. 5ta edición. 752 p. Editorial W. H. Freeman.
- ✓ Rasmussen LPD. 1986. Virus-associated granulocytomas in the marine mussel, *Mytilus edulis*, from three sites in Denmark. *J. Invert. Pathol.* 48 (1), 117-123.
- ✓ Regoli F. 1992. Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 84 (1), 63-69.
- ✓ Regoli F, Nigro M, Orlando E. 1998. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aq. Toxicol.* 40 (4), 375-392.
- ✓ Regoli F, Pellegrini D, Cicero AM, Nigro N, Benedetti M, Gorbi S. 2014. A multidisciplinary weight of evidence approach for environmental risk assessment at the Costa Concordia wreck: integrative indices from Mussel Watch. *Mar. Environ. Res.* 96, 92-104.
- ✓ Rivera-Ingraham GA, Rocchetta I, Bickmeyer U, Meyer S, Abele D. 2016. Spatial compartmentalization of free radical formation and mitochondrial heterogeneity in bivalve gills revealed by live-imaging techniques. *Front. Zool.* 13 (4), 1-17.
- ✓ Rocchetta I, Pasquevich MY, Heras H, Ríos de Molina MC, Luquet CM. 2014. Effects of sewage discharges on lipid and fatty acid composition of the Patagonian bivalve *Diplodon chilensis*. *Mar. Poll. Bull.* 79, 211-219.

- ✓ Roméo M, Frasila C, Gnassia-Barelli M, Damiens G, Micu D, Mustata G. 2005. Biomonitoring of trace metals in the Black Sea (Romania) using mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Water Res.* 39 (4), 596-604.
- ✓ Ruíz MD, Iriel A, Yusseppone MS, Ortiz N, Di Salvatore P, Fernández Cirelli A, Ríos de Molina MC, Calcagno JA, Sabatini SE. 2018. Trace metals and oxidative status in soft tissues of caged mussels (*Aulacomya atra*) on the North Patagonian coastline. *Ecotox. Environ. Saf.* 155, 152-161.
- ✓ Sabatini SE, Rocchetta I, Nahabedian DE, Luquet CM, Eppis MR, Bianchi L, Ríos de Molina MC. 2011. Oxidative stress and histological alterations produced by dietary copper in the fresh water bivalve *Diplodon chilensis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 154, 391-398.
- ✓ Salvador MJ, Moreira S, Dias DA, Zucchi OLAD. 2004. Determination of trace elements in *Alternanthera brasiliana* and *Pfaffia glabrata* by SR-TXRF: application in environmental pollution control. *Instrum. Sci. Technol.* 32 (3), 319-331.
- ✓ San Miguel A, Martín Gil FJ. 2009. Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Gaceta Médica de Bilbao*, 106 (3), 106-113.
- ✓ Sánchez GM. 2005. Artículos de revisión Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especificaciones reactivas del oxígeno. *Rev. Cubana Farm.* 39 (3), 1-11.
- ✓ Santos I, Diniz MS, Carvalho ML, Santos JP. 2014. Assessment of Essential Elements and Heavy Metals Content on *Mytilus galloprovincialis* from River Tagus Estuary. *Biol Trace Elem Res.* 159, :233-240.
- ✓ Sar A, Martín JP, Fernández R, Caminos C. 2018. Ciclo reproductivo y reclutamiento del mejillón *Mytilus edulis platensis* en Bahía San Julián (Santa Cruz, Argentina). *Informe Científico Técnico UNPA*, Vol. 10 (2), 33-51.
- ✓ Sartor A. 2016. Caracterización y Remediación de Marismas Contaminadas con Escorias en San Antonio Oeste (Río Negro, Argentina). III

Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la calidad de Agua. Santa Fe. Argentina.

✓ Seed R. 1969. The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lamellibranchiata) on exposed rocky shores. *Oecol.* 3 (3-4), 277-316.

✓ Sheehan D, Power A. 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 123 (3), 193-199.

✓ Sheenan D, Crimmins KM, Burnell GM. 1991. Evidence for glutathione S-Transferase activity in *Mytilus edulis* as an index of chemical pollution in marine estuaries. *Bio. Environ. Manag.* 419-425.

✓ Sheir SK, Handy RD, Henry TB. 2013. Effect of Pollution History on Immunological Responses and Organ Histology in the Marine Mussel *Mytilus edulis* Exposed to Cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 64 (4), 701-716.

✓ Sicko-Goad L. 1982. A morphometric analysis of algal response to low dose, short-term heavy metal exposure. *Protoplasma* 110 (2), 75-86.

✓ Sokal RR, Rohlf FJ. 1999. *Introducción a la Bioestadística*. Reverté, Barcelona, Spain.

✓ Soldati AL, Jacob BR, Schöne BR, Bianchi MM, Hajduk A. 2010. Microestructura y polimorfismo en valvas recientes de *Diplodon chilensis patagonicus* (d'Orbigny, 1835). *Gayana* 74, 57-65.

✓ Stohs SJ, Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321-336.

✓ Sunila I. 1987. Histopathology of mussels (*Mytilus edulis* L.) from the Tvärminne area, the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Ann. Zool. Fennici* 24, 55-69.

✓ Suvarna KS, Layton C, Bancroft JD. 2019. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques-Elsevier Health Sciences -Fourth Edition*.

✓ Svärth L, Johannesson K. 2001. Incidence of hemocytes and parasites in coastal populations of blue mussels (*Mytilus edulis*) - testing correlations with area, season and distance to industrial impacts. *J. Invert. Pathol.* 80, 22-28.

- ✓ Svärth L, Johannesson K. 2002 .Incidence of hemocytes and parasites in coastal populations of blue mussels (*Mytilus edulis*)-testing correlations with area, season, and distance to industrial plants. J. Inv. Pathol. 80, 22-28.
- ✓ Svärth L. 1999. Bacteria, Granulocytomas, and Trematode Metacercariae in the Digestive Gland of *Mytilus edulis*: Seasonal and Interpopulation Variation. Journal of Invertebrate Pathology 74(3), 275–280.
- ✓ Svärth L. 2003a. Histological and parasitological studies of the blue mussel *Mytilus edulis* L. Doctoral thesis 33 pp.
- ✓ Svärth L. 2003b. Tissue sampling from live blue mussels, *Mytilus edulis*. A field study from the Swedish west coast. J. Sea Res. 49 (3), 221–225.
- ✓ Terman A, Brunk UT. 2004. Molecules in focus: Lipofuscin. Int. J. Biochem. Cell Biol. 36, 1400-1404.
- ✓ Terman A, Brunk UT. 2004. Lipofuscin. Int. J. Biochem. Cell Biol. 36 (8), 1400-1404.
- ✓ Thompson RJ, Ratcliffe NA, Bayne BL. 1974. Effects of starvation on structure and function in the digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.). J. Mar. Biol. Ass. U.K. 54, 699-712.
- ✓ Türkmen M, Ciminli C. 2007. Determination of metals in fish and mussel species by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. Food Chem. 103 (2), 670-675.
- ✓ [United Nations Convention on the law of the Sea. 1982.](#)
- ✓ United Nations Environment Programme. Annual Report 2010.
- ✓ United Nations Environment Programme. Annual Report 2011.
- ✓ Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullas M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecot. Environ. Saf. 64 (2), 178–189.
- ✓ Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57-149.
- ✓ Varotto L, Domeneghetti S, Rosani U, Manfrin C, Cajaraville MP, Raccanelli S, Venier P. 2013. DNA Damage and Transcriptional Changes in the

Gills of *Mytilus galloprovincialis* Exposed to Nanomolar Doses of Combined Metal Salts (Cd, Cu, Hg). PLoS ONE 8 (1), e54602.

✓ Vázquez NN, Gil MA, Esteves JL, Narvarte NA. 2007. Monitoring Heavy Metal Pollution in San Antonio Bay, Río Negro, Argentina. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 79(2), 121-125.

✓ Viarengo A. 1985. Biochemical effects of trace metals. Mar. Poll. Bull. 16 (4), 153-158.

✓ Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Poli G, Moore MN, Orunesu, M. 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis lam*. Comp. Biochem. Physiol. Part C: Comp. Pharmacol. 97 (1), 37-42.

✓ Viarengo A, Nott JA. 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. Part C: Comp. Pharmacol. 104 (3), 355-372.

✓ Viarengo A, Lowe D, Bolognesi C, Fabbri E, Koehler A. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 146, 281-300.

✓ Walsh AR, O'Halloran J. 1997. The Accumulation of Chromium by Mussels *Mytilus edulis (L.)* as a Function of Valency, Solubility and Ligation. Mar. Environ. Res. 43 (1/2), 41-53.

✓ Wilhelm Filho D, Tribess T, Gáspari C, Claudio F, Torres M, Magalhães AR. 2001. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). Aquacul. 203 (1-2), 149-158.

✓ Winterbourn CC. 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. Nat. Chem. Biol. 4 (5), 278-286.

✓ Wright SH, Secomb TW, Bradley TJ. 1987. Apical membrane permeability of *Mytilus* gill: Influence of ultrastructure, salinity and competitive inhibitors on amino acid fluxes. J. Exp. Biol. 129, 205-230.

✓ Ying W, Ahsanullah M, Batley G. 1993. Accumulation and regulation of heavymetals by the intertidal snail *Polonices sordidus*. Mar. Biol. 116, 417-422.