



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**El mitílido *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846) como  
bioindicador y centinela de contaminación ambiental en  
áreas costeras de Argentina**

Tesis presentada para optar al Título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires  
en el área de Ciencias Biológicas

**Lic. Sonia Maribel Landro**

Directora de tesis: Dra. Florencia Arrighetti

Co-directora de tesis: Dra. Miren Pilare Cajaraville Bereciartua

Consejero de Estudios: Dr. Gabriel Manrique

Lugar de trabajo: Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"  
MACN-CONICET

Buenos Aires, julio 2023



**“El mitílido *Brachidontes rodriguezii* (d’Orbigny, 1846) como  
bioindicador y centinela de contaminación ambiental en  
áreas costeras de Argentina”**

Tesis que presenta

**Lic. Sonia Maribel Landro**

Directoras de tesis

**Dra. Miren Pilare Cajaraville Bereciartua (UPV/EHU)**

**Dra. Florencia Arrighetti (FCEyN-UBA)**

Esta tesis se ha desarrollado en cotutela internacional entre la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU, España) y la Universidad de Buenos Aires (UBA, Argentina) como requerimiento parcial para obtener el título de

**Doctor en Ciencias**

en el programa de “Contaminación y Toxicología Ambientales/Environmental Contamination and Toxicology CTA/ECT” del Departamento de Zoología y Biología Celular Animal de la UPV/EHU

Buenos Aires, julio 2023

# **“El mitílido *Brachidontes rodriguezii* (d’Orbigny, 1846) como bioindicador y centinela de contaminación ambiental en áreas costeras de Argentina”**

## **RESUMEN**

En las últimas décadas, los niveles de contaminación presentes en los ambientes marinos han aumentado como consecuencia de distintas actividades de origen antrópico. Es reconocido que el riesgo que producen los contaminantes no puede ser evaluado únicamente en base a análisis químicos de agua y sedimento o de bioacumulación de dichas sustancias en la biota, dado que no brindan información sobre los efectos biológicos que los contaminantes pueden provocar. En consecuencia, se ha implementado el uso de biomarcadores como indicadores de situaciones de estrés en los organismos acuáticos que brindan, además, información sobre el estado de salud de los organismos en distintos niveles de organización.

En el presente trabajo se evaluó la salud ambiental de dos áreas marino-costeras a través de un enfoque integral de contaminación utilizando dos especies de mitílidos, *Brachidontes rodriguezii* (d’Orbigny, 1846) y *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. Así, se estudió en las dos especies, en diferentes niveles de organización, las respuestas a los efectos causados por la contaminación generada por diferentes actividades antrópicas. El objetivo principal fue analizar el potencial uso del mitílido *B. rodriguezii* como centinela y bioindicador de contaminación ambiental para ser propuesto en programas de biomonitoreo de contaminación en áreas costeras. Se eligió a este bivalvo por ser la especie dominante del intermareal rocoso de la Provincia Argentina y un ingeniero ecosistémico clave del ambiente. Además, es capaz de acumular y responder a los contaminantes en varios niveles de complejidad; sin embargo, son escasos los trabajos sobre el uso de esta especie como centinela. En el marco de una estancia de investigación en el extranjero, se analizó un caso de estudio utilizando a la especie *M. galloprovincialis* como centinela de contaminación ambiental en la Bahía de Vizcaya, España. De esta manera, la presente tesis se estructuró en dos secciones, una desarrollada en Argentina —Sección I— y otra en el País Vasco —Sección II. La Sección I, se denomina “Enfoque ambiental integrado para evaluar los efectos

biológicos en el mitílido *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846) en tres ambientes costeros con distintos tipos de impacto antrópico en la Provincia de Buenos Aires (Argentina)”; mientras que, la Sección II, “Enfoque ambiental integrado para evaluar los efectos biológicos en el mitílido *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 en dos localidades del Golfo de Vizcaya, País Vasco (España)”.

En la Sección I el área de estudio comprendió dos sitios con alto impacto antrópico (PC: Planta Camet y PMdP: Puerto Mar del Plata) y un tercer sitio con bajo impacto (PB: Playa Brusquitas), ubicados en la provincia de Buenos Aires. Se analizó la presencia de hidrocarburos alifáticos y aromáticos policíclicos (HAPs) y metales en sedimento; en el mejillín *B. rodriguezii*, además de los compuestos mencionados, se estudió también la presencia de microplásticos (MP) en la masa visceral. Los estudios de ambas matrices se realizaron a lo largo de 4 temporadas: otoño, invierno, primavera 2018 y verano 2019. Se estudiaron las variaciones estacionales de distintos biomarcadores —a nivel bioquímico, celular y tisular— y respuestas fisiológicas para conocer los valores basales y determinar cuál es el período más apropiado para implementar el monitoreo usando esta especie. Los sedimentos de las tres zonas no se encuentran contaminados por metales. PMdP es la zona con mayores niveles de contaminación por hidrocarburos en sedimentos y mejillines, y en menor medida, por MP en mejillines. PC presenta niveles moderados de contaminación por hidrocarburos en sedimentos y mejillines y muy alta cantidad de MP en los mejillines. Por otro lado, si bien se encontraron bajas concentraciones de hidrocarburos y MP en los mejillines de PB, se pudo comprobar que es una zona que puede ser utilizada como referencia (aunque habría que profundizar los estudios con respecto a algunos metales en los mejillines). Dentro de las respuestas bioquímicas, la actividad de la enzima glutatión-s-transferasa sería la mejor indicadora de defensa detoxificante en esta especie. Las respuestas tisulares serían las más recomendadas dada su alta sensibilidad para evaluar distintos cambios morfológicos en la glándula digestiva. Entre estos cambios se recomienda estudiar la atrofia a partir de MLR/MET y MET/MDR (relación entre el radio medio del lumen y altura media del epitelio y la altura media del epitelio y radio medio del túbulo, respectivamente), la pérdida del tejido a partir de CTD (proporción entre tejido conectivo y digestivo), el reemplazo celular a partir de VvBAS (densidad en

volumen de células basófilas). Además, el uso de un índice histopatológico, calculado tanto para la glándula digestiva como para el tejido gonadal, permitió realizar una evaluación general del daño en ambos tejidos. Sumado a estos biomarcadores, las respuestas fisiológicas como la supervivencia al aire y el índice de condición también son respuestas recomendadas en esta especie debido a su sensibilidad, simplicidad y bajo costo. Las respuestas celulares analizadas, es decir, la acumulación intracelular de lípidios neutros, lipofuscinas y depósitos metálicos (BSD), no serían buenos indicadores en *B. rodriguezii*. Algunas de las respuestas biológicas analizadas, se encontraron estrechamente relacionadas con el ciclo reproductivo. Se demostró que se puede utilizar a *B. rodriguezii* como una especie centinela y bioindicadora del estado de salud ambiental, ya que es capaz de concentrar los contaminantes presentes en el ambiente sin sufrir efectos toxicológicos severos; además, dichos efectos pueden evaluarse a través de una amplia gama de respuestas biológicas en distintos niveles de organización. En base a todo lo observado, se sugiere realizar monitoreos una vez al año durante la temporada de invierno, usando como valores basales los reportados para PB.

En la Sección II, el área de estudio comprendió dos sitios con distintos tipos de impacto antrópico ubicados en la Bahía de Vizcaya, Arriluze un sitio en una zona portuaria y Plentzia un sitio de referencia. Se estudió la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos, policlorobifenilos (PCBs) y metales en sedimento y en el mejillón *M. galloprovincialis* en la temporada de primavera. Además, se analizaron distintos biomarcadores —a nivel bioquímico, transcriptómico, celular y tisular— y respuestas fisiológicas. Los sedimentos de ambos sitios no se encuentran contaminados por HAPs, aunque la contaminación de ciertos componentes individuales fue moderada-alta. Ambos sitios presentan contaminación moderada de PCBs y, en Arriluze, la contaminación por metales es principalmente moderada. Sin embargo, en ninguno de los sitios, los mejillones presentan bioacumulación de HAPs y PCBs y la bioacumulación de metales se encuentra por debajo de los límites tóxicos. Estos resultados se corresponden con una tendencia decreciente de estos compuestos a lo largo de los años, aunque también podrían deberse a la restricción de distintas actividades por el confinamiento del COVID-19. De todas formas, se observan efectos de genotoxicidad y daño

de estrés general a través de distintas respuestas. Además, en ambos sitios, varios biomarcadores presentan valores mayores que los críticos de riesgo toxicológico establecidos por ICES para *Mytilus spp.* Esto indicaría que Plentzia, que históricamente fue considerado un sitio de referencia, se encuentra bajo distintas presiones que pueden producir efectos sobre la biota. Esto puede deberse a la presencia de otros contaminantes aquí no medidos como el TBT, microplásticos y desorganizadores endocrinos, que podrían explicar la mayor proporción de machos observada en Arriluze. Se profundizará el estudio de los contaminantes mencionados y el análisis transcricional en la glándula digestiva y se extenderá el análisis al tejido gonadal.

La evaluación del estado de salud ambiental de la Bahía de Vizcaya se ve favorecida por la amplia información disponible sobre distintos criterios de evaluación ambiental, niveles basales de las respuestas biológicas y sus variaciones estacionales en *Mytilus spp.* La información disponible para ambientes y especies de Argentina (y la región sudamericana) es aun escasa por eso esperamos que los resultados aquí presentados contribuyan de manera significativa a futuros estudios y a la aplicación de programas de monitoreo de la contaminación. En este sentido, a) demostramos que *B. rodriguezii* es una buena especie centinela y bioindicadora de contaminación ambiental, b) reportamos los niveles base (y sus variaciones estacionales) para una amplia gama de biomarcadores y respuestas fisiológicas, c) indicamos el periodo más apropiado para realizar el monitoreo de la contaminación usando esta especie.

*Palabras clave: mitílidos, centinelas, biomarcadores, contaminantes, estacionalidad, biomonitoreo*

**“The mytilid *Brachidontes rodriguezii* (d’Orbigny, 1846) as a bioindicator and sentinel organism of environmental contamination in coastal areas of Argentina”**

**ABSTRACT**

In recent decades, levels of pollution in marine environments have increased due to various anthropogenic activities. It is recognized that the risk posed by pollutants cannot be assessed solely on the basis of chemical analyses of water and sediment or of bioaccumulation of these substances in biota, given that they do not provide information on the biological effects that pollutants can cause. As a consequence, the use of biomarkers has been implemented as indicators of stress situations in aquatic organisms that also provide information on the health status of organisms at different levels of organization.

In this study, the environmental health of two marine-coastal areas was evaluated through an integrated approach using two mussel species, *Brachidontes rodriguezii* (d’Orbigny, 1846) and *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. Thus, the responses and effects caused by pollution generated by different anthropogenic activities were studied in the two species, at different levels of biological organisation. The main objective was to analyse the potential use of the mussel *B. rodriguezii* as a sentinel and bioindicator of environmental pollution to be proposed in biomonitoring programs of pollution in coastal areas. This bivalve was chosen because it is the dominant species of the rocky intertidal zone of the Argentine province and a key ecosystem engineer of the environment. In addition, it is able to accumulate and respond to pollutants at several levels of complexity; however, there is little work on the use of this species as a sentinel. In the framework of a research stay abroad, a case study was analysed using the species *M. galloprovincialis* as a sentinel of environmental pollution in the Bay of Biscay, Spain. In this way, the present thesis was structured in two sections, one developed in Argentina —Section I— and another in the Basque Country —Section II. Section I is entitled “Integrated environmental approach to evaluate biological effects in the mussel *Brachidontes rodriguezii* (d’Orbigny, 1846) in three coastal environments with different types

of anthropogenic impact in the Province of Buenos Aires (Argentina)”; while, Section II, “Integrated environmental approach to evaluate biological effects in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 in two localities of the Gulf of Biscay, Basque Country (Spain)”.

In Section I, the study area included two sites with high anthropogenic impact, one called Plant Camet that is near a water treatment plant, and another called Mar del Plata Port that is in a commercial harbour (PC and PMdP by their Spanish acronym, respectively), and a third site with low impact, called Brusquitas beach (PB by its Spanish acronym), the three of them located in the province of Buenos Aires. The presence of aliphatic hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and metals were analysed in sediment and in the small mussel *B. rodriguezii*; and the presence of microplastics (MP) was also analysed in the mussels’ soft tissues. The studies of both matrices were carried out over a period of 4 seasons: autumn, winter, spring 2018, and summer 2019. The seasonal variations of different biomarkers —at biochemical, cellular and tissue levels— and physiological responses were studied to know the basal values and determine the most appropriate period to implement monitoring using this species. None of the three areas is contaminated with metals in their sediments. PMdP is a zone with higher levels of contamination by hydrocarbons in sediments and mussels and, to a lesser extent, by microplastics in mussels. PC presents moderate levels of contamination by hydrocarbons in sediments and mussels and a high amount of microplastics in the mussels. On the other hand, although low concentrations of hydrocarbons and microplastics were found in the mussels of PB, we concluded that it is a zone that can be used as a reference site (although studies should be deepened with respect to some metals in the mussels). Within the biochemical responses, the activity of the enzyme glutathione-s-transferase would be the best indicator of detoxifying defense in this species. Tissue responses would be the most recommended given their high sensitivity for evaluating different morphological changes in the digestive gland. Amongst these changes, we recommend to study: atrophy based on MLR/MET and MET/MDR (mean luminal radius to mean epithelial thickness and mean epithelial thickness to mean diverticular radius, respectively), tissue loss based on CTD (proportion of connective tissue to digestive tissue), and cell replacement based on VvBAS (volume density of basophilic cells). In addition, the use

of a histopathological index, calculated for both the digestive gland and the gonadal tissue, allowed for a general assessment of damage in both tissues. In addition to these biomarkers, physiological responses such as air survival and condition index are also recommended responses in this species due to their sensitivity, simplicity, and low cost. The cellular responses analysed, namely the intracellular accumulation of neutral lipids, lipofuscins, and metal deposits (BSD), would not be good indicators in *B. rodriguezii*. Some of the biological responses analysed were found to be closely related to the reproductive cycle. It was demonstrated that *B. rodriguezii* can be used as a sentinel and bioindicator species of environmental health status, as it is able to concentrate pollutants present in the environment without suffering severe toxicological effects; in addition, these effects can be evaluated through a wide range of biological responses at different levels of organisation. Based on all the above, it is suggested to carry out monitoring once a year during the winter season, using the basal values reported for PB as a reference.

In Section II, the study area included two sites with different types of anthropogenic impact located in the Bay of Biscay, Arriluze, a site in a port area, and Plentzia, a reference site. The presence of PAHs, polychlorinated biphenyls (PCBs), and metals in sediment and mussels *M. galloprovincialis* was studied during the spring season. In addition, a variety of biomarkers at biochemical, transcriptomic, cellular, and tissue levels were analysed, as well as physiological responses. The sediments at both sites were not contaminated with PAHs, although the contamination of certain individual components was moderate-high. Both sites presented moderate contamination of PCBs, and in Arriluze, metal contamination was mainly moderate. However, at neither site did the mussels exhibit bioaccumulation of PAHs and PCBs, and metal bioaccumulation was below toxic limits. These results are consistent with a decreasing trend in these compounds over the years, although they could also be due to the restriction of various activities due to the COVID-19 lockdown. Nonetheless, genotoxicity and general stress damage effects were observed through various responses. In addition, at both sites, several biomarkers presented values higher than the toxicological risk thresholds established by ICES for *Mytilus spp.* This would indicate that Plentzia, which was historically considered a reference site, is under various pressures that can have effects on biota. This

could be due to the presence of other pollutants not measured here, such as TBT, microplastics, and endocrine disruptors, which could explain the higher proportion of males observed in Arriluze. The study of the mentioned pollutants and transcriptomic analysis in the digestive gland will be furthered, and the analysis will be extended to gonadal tissue in a future work.

The assessment of the environmental health status of the Bay of Biscay is facilitated by the availability of extensive information on environmental assessment criteria, baseline levels of biological responses, and their seasonal variations in *Mytilus spp.* The information available for environments and species in Argentina (and the South American region) is still scarce, so we hope that the results presented here will contribute significantly to future studies and the application of pollution monitoring programs. In this sense, we have a) demonstrated that *B. rodriguezii* is a good sentinel and bioindicator species of environmental pollution, b) reported the baseline levels (and their seasonal variations) for a wide range of biomarkers and physiological responses, and c) indicated the most appropriate period for carrying out pollution monitoring using this species.

*Keywords: mussels, sentinels, biomarkers, contaminants, seasonality, biomonitoring*

## AGRADECIMIENTOS

La presente tesis es el trabajo de muchos años y fue realizada con el apoyo de muchas personas, quisiera extender mis más sinceros agradecimientos a:

- el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET), por haberme otorgado la beca doctoral para llevar a cabo esta investigación.

- mi directora Miren Cajaraville por haberse entusiasmado con el proyecto desde el principio, incluso a la distancia. Especialmente por haberme propuesto realizar la tesis en cotutela en la UPV/EHU, una experiencia que nunca olvidaré y que ha marcado mi desarrollo profesional. Le agradezco por haber estado siempre dispuesta a solucionar los problemas con los trámites (que fueron muchos), a hacer videollamadas para estar siempre en contacto, por sus correcciones, por haberme compartido su conocimiento y gran experiencia, y por todas las discusiones valiosas que hemos compartido. Me llevo un gran aprendizaje gracias a ella. También le agradezco haberme abierto las puertas del grupo de investigación “Biología Celular en Toxicología Ambiental (CBET)” y hacerme sentir una integrante más durante mi estancia ahí. Eskerrik asko, Miren!

- todos los integrantes del grupo CBET y de la Estación Marina de Plentzia (PiE) que muy amablemente siempre me orientaron o ayudaron en lo que necesité. Especialmente a Lupe, Alberto Katsumiti, Zenaba Khatir, Noemí Rodríguez y Anthony Nzioka de quienes aprendí mucho y tengo muy lindos recuerdos de mi estancia. A Noemí por los viajes de campo compartidos y por haberme ayudado incluso a la distancia. A Anthony por las horas de laboratorio compartidas, por haberme enseñado tanto y por haberme compartido desinteresadamente todo su conocimiento sobre transcriptómica.

- la Dra. Eider Bilbao del grupo CBET por su buena predisposición y por ser otra de las personas que me orientó, ayudó y enseñó sobre transcriptómica, desinteresadamente.

- Dani y Caro, que en Bilbao me abrieron las puertas de su casa y de su corazón incluso antes de conocerme. Gracias a ellos conocí gente muy valiosa como Yeimi, Manu, Gloria que me hicieron sentir parte de su familia. Llevaré por siempre en mi corazón todos los momentos compartidos, particularmente los días de chinchón y kalimotxos.

- mi familia: mis viejos Mario y Juana, mis hermanos Julián, Melisa, Pamela y Natalia y mi abuela Carmen. Gracias por haber estado siempre y por haber celebrado cada logro de este largo camino. Particularmente a mis hermanas por haberme brindado su amor y apoyo

incondicional y haberme hecho sentir cerca incluso a la distancia. Además, a Pam y Nati les agradezco el especial aguante y ánimo brindado en la etapa final de esta tesis, al igual que al Parce que incluso fue alguien clave contactándome con Dani y Caro.

- mis amigas Belin, Flo, Neity, y Ra por haber sido un apoyo incondicional siempre, estando en detalles como ayudarme a completar formularios. Particularmente a Sil, mi amiga y hermana del alma con quien he compartido todos los altibajos de este doctorado.

- mi Comisión de Seguimiento de Tesis, la Dra. Fabiana Lo Nostro y el Dr. Daniel Medesani, quienes hicieron invaluable comentarios y sugerencias que mejoraron esta tesis.

- la Dra. Sabrina Lavarías del ILPLA-CONICET, quién me enseñó a realizar las mediciones bioquímicas, perfeccionar mis técnicas en la mesada de laboratorio y siempre estuvo dispuesta a responder mis preguntas y compartirme con entusiasmo su conocimiento.

- a la Dra. Natalia Cappelletti de la UNDAV, quien dedicó largos días de trabajo en las determinaciones analíticas dando siempre lo mejor y compartiéndome su conocimiento.

- el laboratorio de “Ecosistemas Costeros, Plataforma y Mar Profundo” del MACN por haber compartido las alegrías y haberme dado aliento cuando las cosas se complicaban. A Débora Ricciardolo por sus ganas de aprender y su invaluable ayuda en la mesada. Especialmente a mis amigas Ceci, Juli, Noe, Sabri, Sofi, Pame y Reni, quienes también me brindaron su apoyo incondicional y con quienes he intercambiado valiosas reflexiones sobre nuestra tarea científica.

Por último, quisiera realizar un especial agradecimiento a mi directora la Dra. Florencia Arrighetti quien ha sido mi mentora desde mi tesina de Licenciatura y con quien tuve el gran placer de realizar este doctorado. Admiro y agradezco su paciencia, entusiasmo, positivismo y acompañamiento a lo largo de todo este camino. Le agradezco por haberme compartido su gran conocimiento y experiencia, por haber estado en las buenas y en las malas, por darme ánimo en los momentos más difíciles, por ayudarme en todo lo que necesité, por haberme dado siempre libertad y, principalmente, por creer en mí. No hubiera podido realizar esta tesis sin su apoyo y dedicación. Gran parte de la científica que soy te lo debo a vos, Flor, y voy a estar eternamente agradecida por eso.

*“Nada en la vida debe ser temido, solo comprendido” - Marie Curie*

# FINANCIACIÓN, BECAS Y PREMIOS

## Financiación

Participación en proyectos de investigación que financiaron el presente trabajo:

- 2016 - 2018. **Bivalvos y gasterópodos marinos como bioindicadores de contaminación por metales en aéreas costeras.** PIP 112-201501-0022. CONICET. Dirección: Dra. Florencia Arrighetti.
- 2018 - 2020. **Indicadores de contaminación y sus variaciones estacionales en la glándula digestiva de bivalvos en el área costera de la provincia de Buenos Aires.** PICT 0669. ANPCyT. Dirección: Dra. Florencia Arrighetti.
- 2019 - 2021. **Distribución espacio-temporal de microplásticos en las costas de la Provincia de Buenos Aires. Impacto en bivalvos y gasterópodos.** PICT 1127. ANPCyT. Dirección: Dra. Florencia Arrighetti.
- 2019 - 2021. **Grupo consolidado tipo A BCTA “Biología Celular en Toxicología Ambiental”.** Ayudas para apoyar las actividades de grupos de investigación del Sistema Universitario Vasco. Departamento de Educación del Gobierno Vasco, convocatoria 2018. Referencia: GIC19/IT-1302-19. Investigadora principal: Prof. Dra. Miren Cajaraville.
- 2021 - 2022 / 2022 - 2023. **“Request for purchasing of biological samples exposed to nanoplastics and transfer of culture protocols in the frame of CAS6 Project”.** Contract with the European Commission- Joint Research Centre (JRC/A/05) to assist the JRC in the Horizon 2020 Framework Programme for Research and Innovation (2014-2020) with respect to the Centre for Advanced Studies (CAS) project “H2020 CAS6 Nanoplastics: Towards a technological platform for nanoplastics detection” (Ref JRC/IPR/2021/VLVP/2824). Investigadora principal: Prof. Dra. Miren Cajaraville
- 2022 - 2023. **Evaluación de microplásticos en moluscos y peces del País Vasco de interés para el consumo humano (MIKRONANOPLAS).** Proyectos de Investigación Focalizada en Agricultura, pesca y alimentación, ELIKA, Gobierno Vasco. Referencia: PA22/01. Dirección: Prof. Dra. Miren Cajaraville.

- 2022 - 2025. **Evaluación integral de contaminantes emergentes y medidas de efectos biológicos en el mejillín *Brachidontes rodriguezii***. PIP 2020-227. CONICET. Dirección: Dra. Florencia Arrighetti.
- 2022 - 2025. **Fate and Impact of Environmentally ReAlistic nanoplastics and of novel bioplastics in the aquatic environment (FIERA)**. MCIU, Proyectos de Investigación orientada de la convocatoria 2021, en el marco del Programa Estatal para Impulsar la Investigación Científico-Técnica y su Transferencia, del Plan Estatal de Investigación Científica, Técnica y de Innovación 2021-2023. Referencia: PID2021-128600OB-I00. Dirección: Prof. Dra. Miren Cajaraville.
- 2022 - 2025. **Grupo consolidado tipo A BCTA “Biología Celular en Toxicología Ambiental-Cell Biology in Environmental Toxicology CBET”**. Ayudas para apoyar las actividades de grupos de investigación del Sistema Universitario Vasco. Departamento de Educación del Gobierno Vasco, convocatoria 2021. Referencia: GIC22/IT-1743-22. Investigador principal: Dr. Maren Ortiz-Zarragoitia

## Becas y premios

- 2017 - 2023. **Beca interna doctoral CONICET, temas estratégicos**. Tema: “*Brachidontes rodriguezii* (d’Orbigny, 1846) como bioindicador de contaminación ambiental en áreas costeras”. Directora: Dra. Florencia Arrighetti. Codirectora: Prof. Dra. Miren Cajaraville.
- 2020. **Beca de ayuda para la estancia en la UPV/EHU de investigadores e investigadoras en formación procedentes de universidades extranjeras, para la elaboración de Tesis Doctorales en régimen de Co-tutela**. Monto asignado para la estancia: €3500.
- 2020. **Beca de movilidad entre instituciones asociadas a la Asociación Universitaria Iberoamericana de Posgrado (AUIP)**. Movilidad entre universidades de Argentina (UBA) y el País Vasco (UPV/EHU). Monto asignado para el ticket de vuelo: €1200.
- 2020. **PADI Foundation Research Grant**. The mussel *Brachidontes rodriguezii* as a sentinel organism to study the effects of contamination derived from anthropogenic activities in coastal areas from Argentina. Monto asignado para el proyecto: US\$5700.

- 2022. **Premio estímulo a la investigación malacológica “Juan José Parodiz”**. Categoría **Posgrado**, “El mitílido *Brachidontes rodriguezii* (d’Orbigny, 1846) como bioindicador y centinela de contaminación ambiental en áreas costeras de Argentina”. \$30000.
- 2022. **Premio a la producción científica de becario/as del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” MACN-CONICET**. **Primera mención**, bienio 2018-2019. \$25000.

## PRESENTACIONES A CONGRESOS Y PUBLICACIONES

### Presentaciones a congresos científicos

1. 4CAM. Congreso Argentino de Malacología. Misiones, Argentina, 24-28 de octubre 2022. Landro, S.M., Lavarías, S.M.L., Etcheverry, L., Cajaraville, M.P., Arrighetti, F. **“Evaluación y relación estacional de respuestas biológicas en el mejillín *Brachidontes rodriguezii* en ambientes costeros con distinto impacto antrópico”**.
2. ESCPB, 32<sup>nd</sup> Congress. New European Society for Comparative Physiology and Biochemistry. Stazione Zoologica Anton Dohrn at the Darwin Dohrn Museum, Nápoles, Italia, 28-31 de agosto 2022. Landro, S.M., Arrighetti, F., Bilbao, E., Cajaraville M.P. **“Integrated assessment of the health status of mussels *Mytilus galloprovincialis* in two localities of the Bay of Biscay”**.
3. 7<sup>th</sup> Workshop for PhD candidates CTA/ECT 2021. Facultad de Ciencia y Tecnología, UPV/EHU, País Vasco, España, 8 de octubre 2021. Landro, S.M., Cajaraville, M.P., Arrighetti, F. **“Integrated biomarker and transcriptomic assessment of the health status of mussels *Mytilus galloprovincialis* in the Bay of Biscay in relation with legacy contaminants and microplastics”**.
4. 6<sup>th</sup> Workshop for PhD candidates CTA/ECT 2020. Estación Marina de Plentzia PIE-UPV/EHU, País Vasco, España, 9 de octubre 2020. Landro, S.M., Cajaraville, M.P., Arrighetti, F. **“The mytilid *Brachidontes rodriguezii* as a bioindicator organism and sentinel of pollution in coastal areas of Argentina”**.

5. 3CAM. Congreso Argentino de Malacología. Bahía Blanca, Argentina, 4-6 de diciembre 2019. Landro, S.M., Teso, V., Arrighetti, F. **“Moluscos como centinelas de contaminación en ambientes marino-costeros”**.
6. XVII COLACMAR. Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar. Mar del Plata, Argentina, 4-8 de noviembre 2019. Landro, S.M., Cajaraville, M.P., Arrighetti, F. **“El mejillín *Brachidontes rodriguezii* como organismo centinela de contaminación costera: evaluación estacional en la provincia de Buenos Aires”**.
7. XVII COLACMAR. Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar. Mar del Plata, Argentina, 4-8 de noviembre 2019. Landro, S.M., García de Hoyos, M.B., Arrighetti, F. **“El mejillín *Brachidontes rodriguezii* como organismo centinela de contaminación costera: caso de estudio en la provincia de Chubut”**.
8. X Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar. Buenos Aires, Argentina, 30 de julio - 3 de agosto 2018. Landro S.M., Arrighetti, F. **“Uso de biomarcadores de efecto para evaluación ambiental en el mejillín *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846)”**.

## Publicaciones científicas

A la fecha de presentación de esta tesis doctoral no se han publicado los resultados de la misma en revistas científicas. Sin embargo, se han publicado diversos trabajos relacionados al uso de invertebrados como centinelas de contaminación, que han contribuido a la formación profesional:

1. Arrighetti, F., **Landro, S.M.**, Lavarías, S.M.L. (2022). **Sensitivity of histopathological and histochemical parameters in the digestive gland of the apple snail *Pomacea canaliculata* exposed to cypermethrin.** *Aquatic Toxicology*, 252, 106292. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106292>
2. Lavarías, S.M.L., Arrighetti, F., **Landro, S.M.**, Colpo, K.D. (2022). **Sensitivity of embryos and larvae of the freshwater prawn *Macrobrachium borellii* to the latest generation pesticide spirotetramat.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 248, 114257. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114257>
3. Lavarías, S.M.L., Colpo, K.D., **Landro, S.M.**, Ambrosio, E.S., Capítulo, A.R., Arrighetti, F. (2021). **Deleterious effects of two pesticide formulations with different toxicological mechanisms in the hepatopancreas of a freshwater prawn.** *Chemosphere*, 131920. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131920>
4. **Landro, S.M.**, Teso, V., Arrighetti, F. (2021). **The panpulmonate limpet *Siphonaria lessonii* Blainville, 1827 as a sentinel of contamination in coastal areas of Argentina.** *Ecological Indicators*, 121, 107075. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107075>
5. San Juan, M.F., Cortelezzi, A., Albornoz, C.B., **Landro, S.M.**, Arrighetti, F., Najle, R., Lavarías, S.M.L. (2020). **Toxicity of pyrethroid cypermethrin on the freshwater snail *Chilina parchappii*: Lethal and sublethal effects.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 196, 110565. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110565>
6. **Landro, S.M.**, Teso, V., Arrighetti, F. (2019). **Morphology of the digestive gland of the marine panpulmonate limpet *Siphonaria lessonii*: A cytological, histochemical, and ultrastructural description.** *Journal of Morphology*, 1–10. <https://doi.org/10.1002/jmor.21043>

7. Arrighetti, F., **Landro, S.M.**, Lambre, M.E., Penchaszadeh, P.E., Teso, V. (2019). **Multiple-biomarker approach in the assessment of the health status of a novel sentinel mussel *Brachidontes rodriguezii* in a harbor area.** *Marine Pollution Bulletin*, 140, 451-461.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.002>

# ÍNDICE

|                                                                                                                                                                                                                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| RESUMEN .....                                                                                                                                                                                                                                                     | i    |
| ABSTRACT .....                                                                                                                                                                                                                                                    | v    |
| AGRADECIMIENTOS .....                                                                                                                                                                                                                                             | ix   |
| FINANCIACIÓN, BECAS Y PREMIOS .....                                                                                                                                                                                                                               | xi   |
| Financiación .....                                                                                                                                                                                                                                                | xi   |
| Becas y premios .....                                                                                                                                                                                                                                             | xii  |
| PRESENTACIONES A CONGRESOS Y PUBLICACIONES .....                                                                                                                                                                                                                  | xiii |
| Presentaciones a congresos científicos .....                                                                                                                                                                                                                      | xiii |
| Publicaciones científicas .....                                                                                                                                                                                                                                   | xv   |
| ÍNDICE .....                                                                                                                                                                                                                                                      | 1    |
| INTRODUCCIÓN GENERAL .....                                                                                                                                                                                                                                        | 5    |
| Contaminación marino-costera .....                                                                                                                                                                                                                                | 5    |
| Mitílidos como organismos bioindicadores y centinelas de contaminación ambiental .....                                                                                                                                                                            | 9    |
| Respuestas biológicas a la contaminación ambiental .....                                                                                                                                                                                                          | 10   |
| Evaluación del riesgo ambiental .....                                                                                                                                                                                                                             | 18   |
| Sobre los objetivos y estructura de esta tesis .....                                                                                                                                                                                                              | 20   |
| OBJETIVO GENERAL .....                                                                                                                                                                                                                                            | 21   |
| HIPÓTESIS GENERAL .....                                                                                                                                                                                                                                           | 21   |
| SECCIÓN I. Enfoque ambiental integrado para evaluar los efectos biológicos en el mitílido <i>Brachidontes rodriguezii</i> (d'Orbigny, 1846) en tres ambientes costeros con distintos tipos de impacto antrópico en la Provincia de Buenos Aires (Argentina) ..... | 22   |
| I.I OBJETIVO .....                                                                                                                                                                                                                                                | 23   |
| I.II OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS ASOCIADAS .....                                                                                                                                                                                                            | 23   |
| I.III INTRODUCCIÓN GENERAL .....                                                                                                                                                                                                                                  | 25   |
| El mitílido <i>Brachidontes rodriguezii</i> (d'Orbigny, 1846) .....                                                                                                                                                                                               | 25   |
| I.IV METODOLOGÍA GENERAL .....                                                                                                                                                                                                                                    | 33   |
| Sitios de estudio .....                                                                                                                                                                                                                                           | 33   |
| Muestreos .....                                                                                                                                                                                                                                                   | 36   |
| Procesado de muestras .....                                                                                                                                                                                                                                       | 37   |
| Análisis estadísticos .....                                                                                                                                                                                                                                       | 38   |
| CAPÍTULO 1. Presencia de contaminantes en <i>Brachidontes rodriguezii</i> en ambientes con distinto impacto antrópico a lo largo del año .....                                                                                                                    | 40   |
| 1.1 MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                                                                                                                                                    | 41   |
| 1.1.1 Factores ambientales .....                                                                                                                                                                                                                                  | 41   |
| 1.1.2 Compuestos orgánicos y metales traza en sedimentos .....                                                                                                                                                                                                    | 41   |
| 1.1.3 Compuestos orgánicos y metales traza en mejillines .....                                                                                                                                                                                                    | 43   |

|                                                                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.1.4 Evaluación del origen de compuestos orgánicos .....                                                                                                                                                    | 43  |
| 1.1.5 Compuestos orgánicos y metales traza en agua .....                                                                                                                                                     | 45  |
| 1.1.6 Microplásticos en mejillines.....                                                                                                                                                                      | 45  |
| 1.1.7 Análisis estadísticos .....                                                                                                                                                                            | 46  |
| 1.2 RESULTADOS.....                                                                                                                                                                                          | 47  |
| 1.2.1 Factores ambientales .....                                                                                                                                                                             | 47  |
| 1.2.2 Compuestos orgánicos y metales traza en sedimento .....                                                                                                                                                | 47  |
| 1.2.3 Compuestos orgánicos y metales traza en mejillín .....                                                                                                                                                 | 54  |
| 1.2.4 Evaluación del origen de los compuestos orgánicos .....                                                                                                                                                | 58  |
| 1.2.5 Microplásticos en mejillines.....                                                                                                                                                                      | 61  |
| 1.3 DISCUSIÓN .....                                                                                                                                                                                          | 65  |
| CAPÍTULO 2. Enfoque de múltiples biomarcadores de contaminación y respuestas fisiológicas en <i>Brachidontes rodriguezii</i> en ambientes con distintos tipos de impacto a lo largo del año .....            | 76  |
| 2.1 MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                                                                                               | 77  |
| 2.1.1 Respuestas de biomarcadores bioquímicos .....                                                                                                                                                          | 77  |
| 2.1.2 Respuestas de biomarcadores celulares en glándula digestiva .....                                                                                                                                      | 78  |
| 2.1.3 Respuestas de biomarcadores tisulares en la glándula digestiva y tejido gonadal .....                                                                                                                  | 80  |
| 2.1.4 Respuestas fisiológicas .....                                                                                                                                                                          | 85  |
| 2.1.5 Integración de las distintas respuestas biológicas .....                                                                                                                                               | 86  |
| 2.1.6 Análisis estadísticos .....                                                                                                                                                                            | 87  |
| 2.2 RESULTADOS.....                                                                                                                                                                                          | 88  |
| 2.2.1 Respuesta de biomarcadores bioquímicos .....                                                                                                                                                           | 88  |
| 2.2.2 Respuestas de biomarcadores celulares en glándula digestiva .....                                                                                                                                      | 92  |
| 2.2.3 Respuestas de biomarcadores tisulares en glándula digestiva y tejido gonadal .....                                                                                                                     | 96  |
| 2.2.4 Respuestas fisiológicas .....                                                                                                                                                                          | 117 |
| 2.2.5 Integración de las distintas respuestas biológicas .....                                                                                                                                               | 126 |
| 2.3 DISCUSIÓN .....                                                                                                                                                                                          | 128 |
| SECCIÓN II. Enfoque ambiental integrado para evaluar los efectos biológicos en el mitílido <i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819 en dos localidades del Golfo de Vizcaya, País Vasco (España) ..... | 145 |
| II.I OBJETIVO .....                                                                                                                                                                                          | 146 |
| II.II OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS ASOCIADAS .....                                                                                                                                                      | 146 |
| II.III INTRODUCCIÓN GENERAL .....                                                                                                                                                                            | 147 |
| El mitílido <i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819 .....                                                                                                                                             | 147 |
| II.IV METODOLOGÍA GENERAL.....                                                                                                                                                                               | 152 |
| Sitios de estudio.....                                                                                                                                                                                       | 152 |
| Muestreo .....                                                                                                                                                                                               | 154 |
| Procesado de muestras .....                                                                                                                                                                                  | 155 |

|                                                                                                                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Análisis estadísticos .....                                                                                                                                                             | 156 |
| CAPÍTULO 1. Presencia de contaminantes en <i>Mytilus galloprovincialis</i> en ambientes con distinto tipo de impacto antrópico .....                                                    | 158 |
| 1.1 MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                                                                          | 159 |
| 1.1.1 Factores ambientales .....                                                                                                                                                        | 159 |
| 1.1.2 Compuestos orgánicos persistentes y metales traza en sedimento .....                                                                                                              | 159 |
| 1.1.3 Compuestos orgánicos persistentes y metales traza en mejillones.....                                                                                                              | 160 |
| 1.1.4 Evaluación del origen de los hidrocarburos aromáticos policíclicos .....                                                                                                          | 161 |
| 1.1.5 Análisis estadísticos .....                                                                                                                                                       | 161 |
| 1.2 RESULTADOS .....                                                                                                                                                                    | 162 |
| 1.2.1 Factores ambientales .....                                                                                                                                                        | 162 |
| 1.2.2 Compuestos orgánicos persistentes y metales traza en sedimento .....                                                                                                              | 162 |
| 1.2.3 Compuestos orgánicos persistentes y metales en mejillones .....                                                                                                                   | 165 |
| 1.2.4 Evaluación del origen de los hidrocarburos aromáticos policíclicos .....                                                                                                          | 167 |
| 1.2.5 Compuestos orgánicos y metales traza en agua .....                                                                                                                                | 168 |
| 1.3 DISCUSIÓN .....                                                                                                                                                                     | 168 |
| CAPÍTULO 2. Enfoque de múltiples biomarcadores de contaminación y respuestas fisiológicas en <i>Mytilus galloprovincialis</i> en ambientes con distinto tipo de impacto antrópico ..... | 172 |
| 2.1 MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                                                                          | 173 |
| 2.1.1 Respuestas de biomarcadores bioquímicos y de genotoxicidad .....                                                                                                                  | 173 |
| 2.1.2 Respuestas de biomarcadores celulares en la glándula digestiva .....                                                                                                              | 178 |
| 2.1.3 Respuestas de biomarcadores tisulares en la glándula digestiva y tejido gonadal .....                                                                                             | 178 |
| 2.1.4 Respuestas fisiológicas .....                                                                                                                                                     | 180 |
| 2.1.5 Integración de las distintas respuestas biológicas .....                                                                                                                          | 181 |
| 2.1.6 Análisis estadísticos .....                                                                                                                                                       | 181 |
| 2.2 RESULTADOS .....                                                                                                                                                                    | 182 |
| 2.2.1 Respuestas de biomarcadores bioquímicos y de genotoxicidad .....                                                                                                                  | 182 |
| 2.2.2 Respuestas de biomarcadores celulares en la glándula digestiva .....                                                                                                              | 186 |
| 2.2.3 Respuestas de biomarcadores tisulares en glándula digestiva y tejido gonadal .....                                                                                                | 186 |
| 2.2.4 Respuestas fisiológicas .....                                                                                                                                                     | 200 |
| 2.2.5 Integración de las distintas respuestas biológicas .....                                                                                                                          | 206 |
| 2.3 DISCUSIÓN .....                                                                                                                                                                     | 208 |
| CONCLUSIONES.....                                                                                                                                                                       | 220 |
| REFERENCIAS .....                                                                                                                                                                       | 226 |
| ANEXO: Protocolos de laboratorio .....                                                                                                                                                  | 252 |
| Abundancia de microplásticos en masa visceral .....                                                                                                                                     | 252 |
| Determinaciones bioquímicas .....                                                                                                                                                       | 254 |

|                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Acumulación intracelular de lipofuscinas.....                                           | 259 |
| Acumulación intracelular de lípidos neutros.....                                        | 260 |
| Inclusión de muestras para histología en resina plástica.....                           | 262 |
| Inclusión de muestras para histología en parafina.....                                  | 262 |
| Análisis autometalográfico para la detección de depósitos metálicos.....                | 264 |
| Tinción de hematoxilina-eosina para muestras incluidas en resina plástica.....          | 265 |
| Tinción de hematoxilina-eosina para muestras incluidas en parafina.....                 | 266 |
| Análisis morfométrico de los túbulos digestivos.....                                    | 267 |
| Análisis estereológico de la composición celular e integridad del tejido digestivo..... | 269 |
| Análisis histopatológico y parasitosis.....                                             | 270 |
| Índices histopatológicos en glándula digestiva y tejido gonadal.....                    | 271 |
| Desarrollo gametogénico e índice gonadal.....                                           | 273 |
| Índice de condición del estado de salud general.....                                    | 274 |
| Supervivencia al aire.....                                                              | 274 |
| Análisis transcriptómico en <i>M. galloprovincialis</i> .....                           | 275 |
| Frecuencia de micronúcleos y brotes nucleares en hialinocitos.....                      | 283 |
| Ensayo Cometa.....                                                                      | 285 |
| Medición de la actividad enzimática de palmitoil-CoA oxidasa.....                       | 286 |

# INTRODUCCIÓN GENERAL

## Contaminación marino-costera

Cuando hablamos de contaminación ambiental, es común entender que nos referimos a sustancias que, de alguna manera, y generalmente por acción del hombre, han llegado al ambiente y podrían provocar una alteración o daño en él o las distintas matrices que lo componen (aire, suelo, agua o biota). Sin embargo, el término contaminación no implica necesariamente un efecto negativo, sino la mera presencia de una sustancia donde no debería estar o que se halla en concentraciones superiores a los niveles de base. En cambio, cuando esos niveles provocan efectos biológicos negativos, hablamos de polución (Chapman, 2007). En este sentido, Muniz y colaboradores (2013), refiriéndose particularmente a la contaminación marina, definen a la contaminación como el “ingreso de material y/o energía a los ecosistemas acuáticos y que puede ocasionar cambios en las concentraciones de los compuestos en el sistema al que ingresa, pero que no necesariamente provoca efectos sobre los individuos, poblaciones, comunidades y/o ecosistemas” mientras que reservan el término polución a toda “sustancia (materia o energía) introducida en el ambiente como resultado de actividades antrópicas en cantidades suficientes para producir efectos degradantes sobre la vida” (Muniz et al., 2013). De este modo, la producción, uso y liberación de distintas sustancias utilizadas tanto en procesos industriales como en la vida cotidiana, suelen acabar en los cuerpos de agua como xenobióticos causando contaminación o polución, un problema global que contribuye al empobrecimiento de la calidad ambiental y consecuentemente a la pérdida de biodiversidad.

En las últimas décadas, los niveles de contaminación presentes en los ambientes acuáticos han aumentado como consecuencia de distintas actividades de origen antrópico a nivel global (Islam y Tanaka, 2004; Halpern et al., 2008; Aronson et al., 2011; Tornero y Hanke, 2016; Häder et al., 2020). La zona costera es un ecotono en el cual el ecosistema terrestre, marino y aéreo convergen, como así también los usos de cada uno de estos ambientes. La densidad poblacional humana en esta zona es aproximadamente tres veces mayor que el promedio global (Intergovernmental Oceanographic Commission, 2011) debido

a la importancia que tiene este ambiente en la economía global. También es de particular interés ya que provee múltiples servicios ecosistémicos, como la regulación del clima y la atmósfera, el ciclado de nutrientes, la productividad primaria, la diversidad biológica, absorción de dióxido de carbono (Miglioranza, 2021). Todas las actividades que se producen en las costas, como pesquerías, acuicultura, turismo, actividades portuarias, transporte marítimo y desarrollo de energía, generan un número elevado de presiones que emiten a los océanos distintos contaminantes.

La contaminación en los ambientes marino-costeros puede ser de origen terrestre, marino y atmosférico. Según el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP, por sus siglas en inglés) aunque puedan encontrarse diferencias sitio-específicas, en general, los contaminantes de origen terrestre generan hasta el 80% de la contaminación marina y sus fuentes pueden ser las descargas de ríos, arroyos, estuarios, desechos municipales, industriales y agrícolas, los desagües y las escorrentías. Se estima que el origen del otro 20% de los contaminantes es de origen marítimo, como el vertido deliberado o accidental de hidrocarburos de los buques y de las plantas de extracción de petróleo submarinas (UNEP, 2016). La contaminación puede tener también un origen atmosférico, por ejemplo, como producto de la deposición de compuestos gaseosos. Estos contaminantes, pueden surgir de puntos no específicos relacionados con la ubicación de las industrias, desarrollos urbanísticos y zonas agrícolas generando un impacto indirecto o contaminación difusa, o a partir de puntos específicos que generan un impacto directo en el área o contaminación puntual como son los vertidos industriales o de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales.

Un gran número de convenciones internacionales como los Convenios de Estocolmo, de Rotterdam y de Basel (UNEP, 2019) han logrado, a lo largo de los años, regular el uso de ciertos contaminantes como metales, hidrocarburos y contaminantes orgánicos persistentes (hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos, organoclorados, etc.). Sin embargo, debido a su persistencia aún hoy se encuentran en el ambiente. Estos compuestos suelen ser llamados “contaminantes históricos o heredados” y han sido monitoreados química y biológicamente en las últimas décadas, principalmente en el hemisferio norte (Thain et al., 2008; Lyons et al.,

2010; Collins et al., 2011; Roose et al., 2011). Por otro lado, recientemente han comenzado a surgir los “contaminantes de preocupación emergente”, que son aquellos que han sido detectados en el ambiente pero que aún no fueron incluidos en programas de monitoreo y su comportamiento e impacto toxicológico son poco conocidos, como por ejemplo los microplásticos, fármacos, o productos de cuidado personal.

Los metales ingresan a los ecosistemas acuáticos principalmente por vías naturales como la erosión de rocas, vulcanismo y la quema de bosques, y por procesos derivados de las actividades humanas. Algunos metales, como el Fe, Zn, Cu, son esenciales para el organismo, pero en concentraciones elevadas pueden ser tóxicos. Otros, como el Pb, Cd, As y Hg no están presentes de manera natural en los organismos y pueden resultar tóxicos incluso en concentraciones mínimas. La presencia de estos contaminantes en el ambiente presenta un alto riesgo debido que no son ni química ni biológicamente degradables y pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años (Muniz et al., 2013); además pueden acumularse en los organismos y biomagnificarse a través de las cadenas tróficas. Los hidrocarburos se encuentran naturalmente como parte de la materia orgánica, pero también introducidos por el hombre como componentes del petróleo. Los hidrocarburos alifáticos, como los n-alcanos, alcanos isoprenoides, y los aromáticos policíclicos (HAPs) son habitualmente estudiados en los programas de control ambiental. Algunos HAPs son altamente persistentes y bioacumulables y generan efectos cancerígenos y genotóxicos en la biota (Bolognesi et al., 1992). Los compuestos organoclorados, como los pesticidas organoclorados (el lindano o DDT, entre otros) y los policlorobifenilos (PCBs), usados en componentes eléctricos, no se presentan naturalmente en el ambiente y son altamente persistentes, debido a su alta resistencia a la degradación química, biológica y fotolítica. La exposición crónica a bajas concentraciones de estos contaminantes puede causar inmunodeficiencia, disminución de la eficiencia reproductiva y carcinogénesis (Muniz et al., 2013).

Por otro lado, dentro de los contaminantes emergentes, la acumulación de microplásticos (MP = partículas de plástico < 5 mm de diámetro, GESAMP, 2015) es uno de

los problemas ambientales de preocupación emergente más abordado en la última década (Wang et al., 2021). Estos pueden ingresar al ambiente acuático ya sea por las actividades humanas terrestres, los efluentes cloacales y la descarga de los ríos o marítimas como la pesca, náutica, etc. (Xu et al., 2020; Vivekanand et al., 2021). La ingestión de MP ha sido bien documentada para una gran variedad de especies (Li et al., 2015; Van Cauwenberghe et al., 2015; Rezania et al., 2018; Xu et al., 2020). Su acumulación puede causar daños físicos como bloqueos en el tracto digestivo, disminución en la alimentación, en el metabolismo y en las reservas energéticas provocando efectos adversos en el crecimiento, desarrollo y reproducción (Wright et al., 2013; Sussarellu et al., 2016; Galloway et al., 2017). También, pueden bioacumularse en diferentes tejidos provocando alteraciones a nivel celular, cambios en las actividades enzimáticas y genotoxicidad, entre otros (Browne et al., 2008; von Moos et al., 2012; Xu et al., 2020; Sendra et al., 2021)

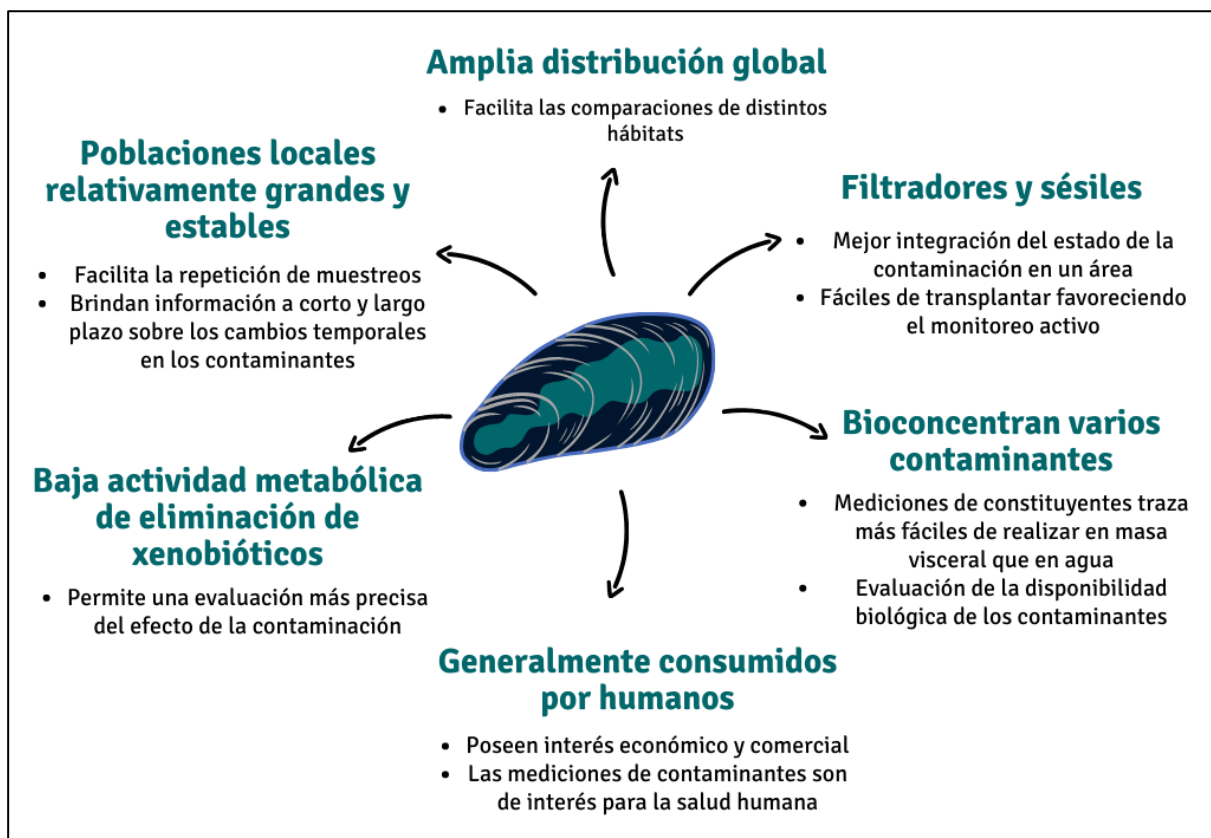
Si bien la detección temprana de todos estos contaminantes a partir de su cuantificación en agua, sedimento o tejidos es útil, no es suficiente, ya que no brinda información sobre los efectos deletéreos o las distintas alteraciones que pueden producir sobre la biota, es decir, si la contaminación se ha convertido en polución. Además, debido al costo y a la dificultad que conlleva el monitoreo de todos estos contaminantes en el ambiente marino, es necesario el desarrollo y uso de indicadores que representan un enfoque más rentable (Brown y Takada, 2017).

La contaminación ambiental puede evaluarse a partir del uso de indicadores ambientales, que son medidas indirectas pero que representan las condiciones ambientales del ecosistema (Muniz et al., 2013). Cuando estos indicadores se tratan de especies u organismos sensibles a la contaminación hablamos de bioindicadores. La evaluación integral de la contaminación, es decir, la combinación de monitoreo químico y sus efectos biológicos usando especies bioindicadoras y centinelas permite entender los daños ambientales causados por los contaminantes en ecosistemas marinos de manera global. En este sentido, cabe destacar la diferencia entre organismos bioindicadores y centinelas que, aunque a veces sean utilizados como sinónimos, estrictamente no lo son. Un organismo bioindicador es aquel que brinda información sobre la calidad del ambiente mientras que un organismo centinela es

aquel que brinda información sobre los aspectos cuantitativos de la calidad del ambiente. Así, un centinela es siempre un bioindicador pero un bioindicador no necesariamente es un centinela (Markert et al., 2003). Es decir, las especies centinelas son monitores biológicos que acumulan un contaminante en sus cuerpos sin efectos adversos significativos y que pueden utilizarse para medir de alguna manera sensible la cantidad de contaminante biológicamente disponible (Beeby, 2001).

## Mitílidos como organismos bioindicadores y centinelas de contaminación ambiental

Uno de los modelos de estudio más utilizados en programas de biomonitoreo son los moluscos. Estos representan, luego de los artrópodos, el segundo grupo más numeroso de animales del planeta, con alrededor de 200.000 especies vivientes y un notable registro fósil. Además, se trata del grupo más diverso: ocho clases vivientes y, al menos, dos extintas (Ponder et al., 2020). En 1975, se creó el programa de monitoreo *Mussel Watch* (Monitoreo/Vigilancia del mejillón, en español), en donde se propusieron desarrollar y aplicar, anualmente y a nivel mundial, un programa de biomonitoreo de bajo costo utilizando al mejillón *Mytilus edulis* (u otros bivalvos similares) como especie centinela de contaminación (Goldberg, 1975). Así, se evaluarían las tendencias de contaminación de distintos compuestos químicos como hidrocarburos halogenados, metales y petróleo. Desde su implementación a la fecha, los mitílidos han ocupado un rol protagónico como modelo de estudio en los programas de monitoreo debido a las características que poseen (Farrington et al., 1983; Beyer et al., 2017). Dichas características se encuentran resumidas en la Figura 1. Entre las distintas cualidades, se destacan que poseen una amplia distribución global, son sésiles y fáciles de recolectar. Además, al ser filtradores y presentar baja actividad metabólica y baja capacidad de excreción pueden reflejar los contaminantes presentes en el ambiente. Son relativamente tolerantes a una amplia variedad de condiciones ambientales, incluyendo niveles moderados de contaminación y, como consumidores primarios, son especies claves en las redes tróficas (Beeby, 2001; Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003; Beyer et al., 2017).



**Figura 1.** Características de los mitílidos que los convierten en buenos centinelas de contaminación en programas de biomonitoreo.

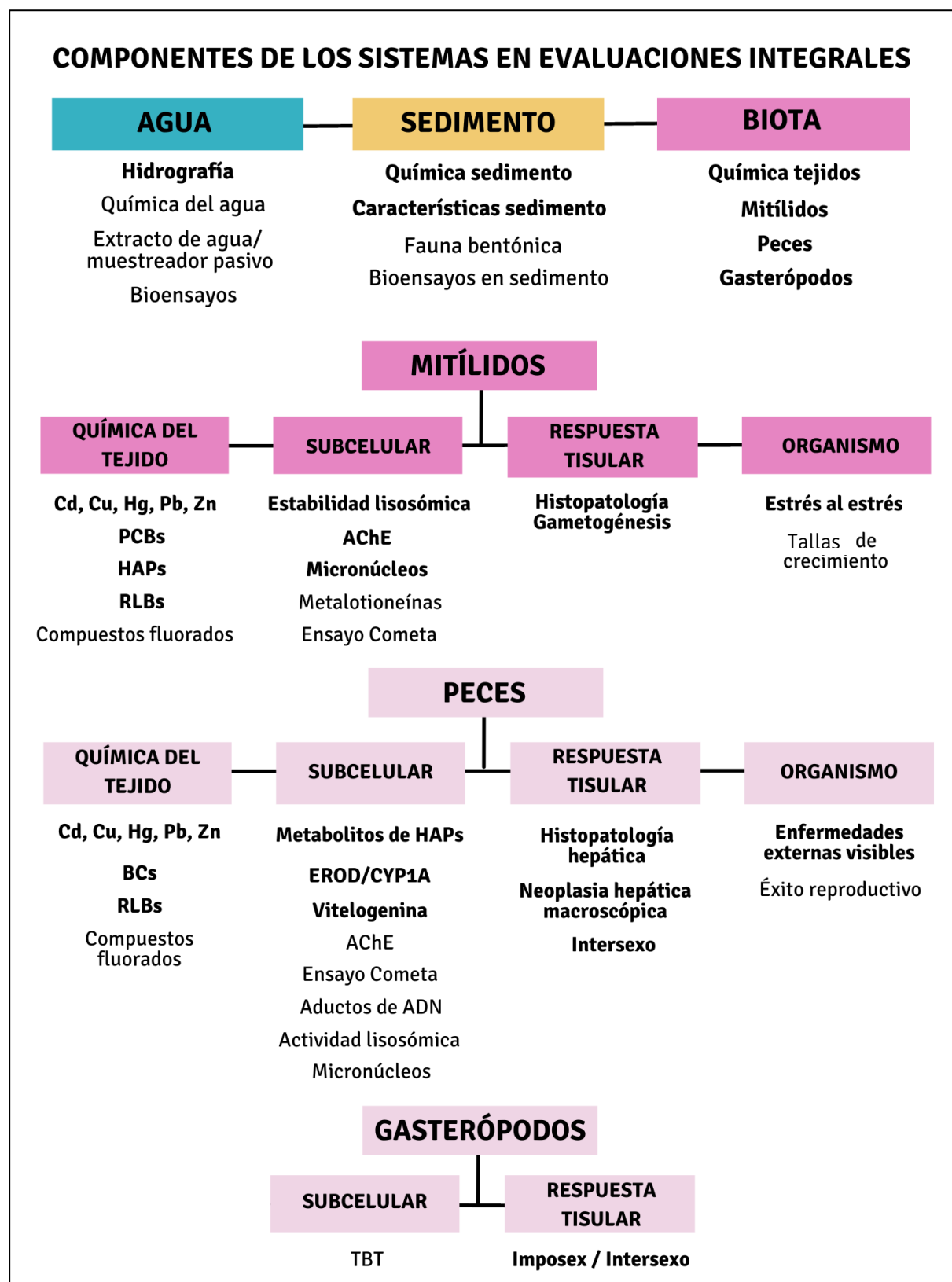
## Respuestas biológicas a la contaminación ambiental

La ONU creó en 1972 el “Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente”, conocido como UNEP por sus siglas en inglés. Este programa obra como autoridad global, estableciendo la agenda ambiental y promoviendo la implementación coherente del desarrollo sostenible en el sistema de las Naciones Unidas, entre otras tareas (<https://www.unep.org/es>). Dentro de su esfera, operan distintas organizaciones como OSPAR (Convención para la Protección del Medio Ambiente Marino del Atlántico del Nordeste), que es un mecanismo de acción conjunta entre 15 países europeos y la Unión Europea, o ICES (Consejo Internacional para la Exploración del Mar), una organización intergubernamental de ciencia marina constituida por 20 países europeos, asiáticos y Estados Unidos. El objetivo principal de estas organizaciones es proveer guías con conceptos y estrategias, y generar documentos de base con sugerencias, metodologías, referencias y anexos que brinden una información detallada

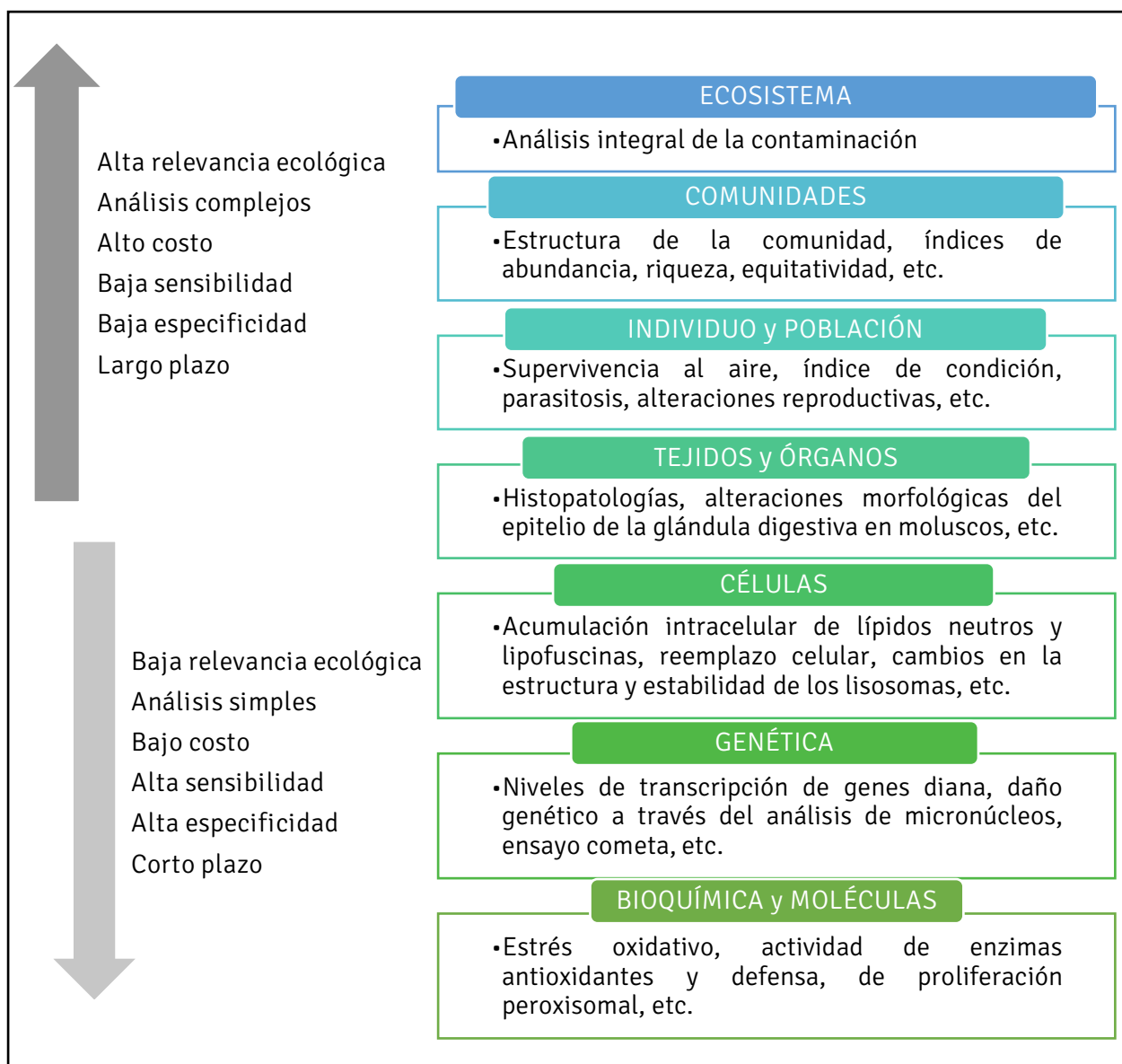
sobre cómo realizar una evaluación integrada usando especies centinela (Davies y Vethaak, 2012) (Figura 2).

Las respuestas a estresores ambientales pueden ser evaluadas en distintos niveles de organización biológica, desde el nivel molecular o bioquímico hasta el nivel poblacional o de comunidad (Mearns et al., 2019). Esto hace que se presente un compromiso entre la escala temporal, la especificidad y relevancia ecológica que cada respuesta supone (Figura 3). En resumen, los efectos biológicos en los niveles más bajos responden de manera relativamente rápida y tienen baja relevancia ecológica mientras que aquellos que ocurren en niveles más altos de organización biológica responden más lentamente, pero son más relevantes ecológicamente (Adams et al., 1989).

Los biomarcadores, en particular, son respuestas o parámetros medibles a nivel suborganísmico (molecular, bioquímico, genético, celular o tisular) que sirven como herramientas de alerta temprana y permiten evaluar los efectos subletales de un contaminante o situación de estrés (McCarthy y Shugart, 1990; Markert et al., 2003). Anticipan cambios en niveles más altos de organización (poblaciones, comunidades y ecosistemas), y por ello son considerados “indicadores a corto plazo de los efectos biológicos a largo plazo” (Cajaraville et al., 2000). Pueden clasificarse en biomarcadores de exposición, de efecto o de susceptibilidad. Un biomarcador de exposición es la presencia o evidencia de un compuesto, sus metabolitos u otros productos, o algún cambio que pueda asociarse con la presencia de un estresor, es decir, indica si el organismo ha sido expuesto a cierta sustancia. Un biomarcador de efecto representa el cambio en la presencia, estado o capacidad funcional de distintos parámetros por la exposición a un estresor, es decir, revela la magnitud de la respuesta del organismo luego de haber sido expuesto a una sustancia. Por último, un biomarcador de susceptibilidad indica la presencia o cambio en algún parámetro que indica que el individuo puede ser más sensible a los efectos de cierto estresor (McCarty y Munkittrick, 1996).



**Figura 2.** Componentes principales del esquema de trabajo y estrategias brindados por OSPAR/ICES para el monitoreo integral de efectos químicos y biológicos en agua, sedimento y biota. Se detallan los métodos centrales (en negrita) y los métodos adicionales. AChE: acetilcolinesterasa, PCBs: policlorobifenilos, HAPs: hidrocarburos aromáticos policíclicos, RLBs: retardantes de llama bromados, BCs: bifenilos clorados, EROD: etoxirresorufina-O-deetilasa, CYP1A: citocromo P450 1A. Para más detalles ver Davies y Vethaak (2012).



**Figura 3.** Respuestas biológicas a distintos niveles de organización en relación con sus distintas ventajas y desventajas según la escala temporal y relevancia ecológica. Se señalan, dentro de cada nivel, algunos ejemplos de posibles análisis o respuestas.

El uso de biomarcadores como indicadores de estrés ambiental ha sido ampliamente utilizado en los sistemas acuáticos (Cajaraville et al., 2000; Viarengo et al., 2007; de los Ríos et al., 2016b; Blaise et al., 2017). A continuación, se mencionarán algunos de los biomarcadores y respuestas que pueden encontrarse en las guías propuestas por UNEP e ICES (UNEP/RAMOGGE, 1999; Davies y Vethaak, 2012).

## ***Biomarcadores bioquímicos***

El estrés oxidativo es una respuesta frente a una situación de estrés ambiental comúnmente estudiada en bivalvos. Es básicamente un desequilibrio entre la producción celular de especies reactivas del oxígeno (ERO) y los mecanismos de defensa antioxidantes. La inducción de los mecanismos antioxidantes podría ser una reacción compensatoria para contrarrestar el aumento de la formación de ERO o, por el contrario, su inhibición aumentaría la acumulación de ERO provocando efectos tóxicos, como peroxidación lipídica de la membrana celular, degradación de proteínas, inactivación de enzimas y daños en el ADN (Regoli, 2000; Xie et al., 2016). Dentro de las enzimas involucradas en las defensas antioxidantes encontramos, entre otras, a la superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la dismutación del radical superóxido (una de las principales ERO) en oxígeno y peróxido de hidrógeno y a la catalasa (CAT) que degrada el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. También existen otras enzimas secundarias (o de biotransformación o fase II de metabolismo), como la glutatión-S-transferasa (GST), que actúan catalizando reacciones de detoxificación celular.

Numerosos trabajos evidencian que la exposición a contaminantes (HAPs, pesticidas, PCBs, metales) o situaciones de estrés pueden inducir la formación intracelular de ERO (Lushchak, 2011). Esta acumulación puede inducir o inhibir las defensas antioxidantes, por lo tanto las variaciones observadas en este sistema son consideradas biomarcadores de efecto o de estrés no específico (Livingstone, 1993; Regoli, 2000; Kamel et al., 2012; Chandurvelan et al., 2015; Cajaraville et al., 2016; Montserrat, 2021).

Por otro lado, la exposición a los contaminantes como HAPs y PCBs puede provocar proliferación en los peroxisomas, organelas involucradas en el metabolismo de los lípidos (Cancio et al., 1999; Cajaraville et al., 2003; Orbea y Cajaraville, 2006). Esta proliferación puede medirse mediante la inducción de la actividad de la enzima palmitoil-CoA oxidasa (AOX1), que es la enzima involucrada en el primer paso de la  $\beta$ -oxidación peroxisomal de ácidos grasos.

## ***Biomarcadores genéticos***

La exposición a diversos xenobióticos (físicos, químicos o biológicos) puede provocar alteraciones sobre el material genético. Este daño puede desarrollar modificaciones permanentes en la estructura del ADN que podrían conducir a una modificación en la función de las proteínas, en la activación o inactivación de algunos genes, o mutaciones a nivel génico o cromosómico. Si estas mutaciones se producen en genes claves en la diferenciación, comunicación o crecimiento celular pueden provocarse alteraciones en las funciones celulares o directamente la muerte celular (Bolognesi et al., 1999). Dentro de los análisis de genotoxicidad comúnmente usados en bivalvos, se encuentran la electroforesis en gel de células individuales, comúnmente llamado ensayo cometa, y la frecuencia de micronúcleos (MN) (Baršienė et al., 2012; Lyons et al., 2012). El ensayo cometa permite evaluar la fragmentación —reversible— de las hebras de ADN, mientras que la frecuencia de MN evalúa el daño en el ADN cromosómico —irreversible— que puede resultar tanto de la ruptura de los cromosomas como de una falla en la segregación cromosómica durante la mitosis (Bolognesi y Fenech, 2012).

Por otro lado, la exposición a metales puede ser evaluada midiendo los niveles de transcripción del gen de metalotioneínas 20 (*mt20*) (Hylland, 2012). Las metalotioneínas son proteínas de bajo peso molecular que tienen una alta afinidad por los cationes y participan en la homeostasis intracelular de los metales. Hay numerosas evidencias de la inducción en la expresión de este gen en mejillones expuestos a metales (de los Ríos et al., 2013, 2018; Carella et al., 2018; Rocha et al., 2018)

De acuerdo a la EPA (2013), los desorganizadores endocrinos son agentes que pueden alterar la producción, liberación, transporte, metabolismo o eliminación de las hormonas naturales del cuerpo como los estrógenos. La exposición a contaminantes orgánicos que pueden causar desorganización endocrina, por ejemplo, los HAPs, puede evaluarse mediante la inducción del gen de la vitelogenina (*vtg*) en el tejido gonadal de los machos (Ortiz-Zarragoitia y Cajaraville, 2006). La vitelogenina es el principal precursor del vitelo presente en los oocitos y su síntesis está regulada por hormonas esteroideas. En machos, durante la gametogénesis, los niveles de esta proteína son indetectables, pero aumentan luego de la

exposición a contaminantes estrogénicos, y puede detectarse un aumento en la expresión de este gen (de los Ríos et al., 2012, 2013; Cajaraville et al., 2016; de los Ríos et al., 2016b).

### ***Biomarcadores celulares***

A nivel celular, los biomarcadores de estrés no específicos destacados son aquellos que evalúan las alteraciones que se producen en los lisosomas, en los lípidos neutros y en las lipofuscinas (Cajaraville et al., 1995, 2000; Viarengo et al., 2007; Koukouzika et al., 2009; Marigómez et al., 2013a; Brooks et al., 2015; Blanco-Rayón et al., 2020).

Los lisosomas presentes en las células digestivas de los moluscos, además de participar en la digestión intracelular y en procesos autofágicos, tienen una función importante en la acumulación de compuestos tóxicos (Marigómez y Baybay-Villacorta, 2003; Raftopoulou y Dimitriadis, 2012). Esto genera un aumento en el volumen o en el número de lisosomas que puede ser medido mediante la acumulación de lípidos neutros (LN) (Moore, 1988). Esta acumulación puede estar relacionada a la autofagia del exceso de lípidos o a la peroxidación lipídica, que como producto final forma lipofuscinas (LF), es por ello que su acumulación también puede usarse como un biomarcador de estrés general (Regoli, 1992). Las alteraciones lisosomales y la acumulación de LN, en particular, también suele estar asociada a la exposición a contaminantes orgánicos (Marigómez y Baybay-Villacorta, 2003; Marigómez et al., 2006; Garmendia et al., 2011a; Marigómez et al., 2013a).

En este nivel, la bioacumulación de metales puede ser inferida a través de técnicas autometalográficas que consisten en la detección histoquímica de depósitos metálicos dentro de los lisosomas de las células digestivas (Soto y Marigómez, 1997; Marigómez et al., 2002; Raftopoulou et al., 2003)

### ***Biomarcadores a nivel tisular***

La histología es una herramienta útil para evaluar los efectos subletales y crónicos de la contaminación (Bignell et al., 2012). En el caso de los moluscos, y en particular los bivalvos, la glándula digestiva suele ser el órgano más estudiado ya que tiene un rol central en la acumulación, detoxificación y eliminación de xenobióticos (Faggio et al., 2018). La detección

de alteraciones histológicas y los cambios en la morfología y en la composición celular de los túbulos de la glándula digestiva es generalmente una de las herramientas más sensibles para monitorear la respuesta a estresores ambientales (Marigómez et al., 2006; Aarab et al., 2008; Garmendia et al., 2011b; Costa et al., 2013; Cuevas et al., 2015; Vázquez et al., 2015). En los moluscos, en términos generales, la glándula digestiva presenta un epitelio simple, compuesto por al menos dos tipos celulares: las células digestivas y las células basófilas. Bajo condiciones fisiológicas normales las células digestivas son mucho más abundantes que las basófilas, pero bajo situaciones de estrés la proporción relativa de células basófilas aumenta, una situación denominada reemplazo celular (Marigómez et al., 1998; Zaldibar et al., 2007b). Los cambios morfológicos en la glándula digestiva se pueden cuantificar evaluando la atrofia en el epitelio digestivo. Este epitelio, en condiciones normales, sufre cambios que son atribuidos a la disponibilidad de alimento (Mathers et al., 1979), pero también se ha demostrado que estos cambios pueden producirse frente a la exposición a contaminantes (Vega et al., 1989; Cajaraville et al., 1992; Marigómez et al., 2006; Garmendia et al., 2010; Brooks et al., 2011). Entre ellos se observa una reducción tanto en la masa como en la altura del epitelio, que en última instancia produce atrofia o pérdida del tejido digestivo, y puede evaluarse midiendo la proporción entre tejido conectivo y digestivo (CTD, por sus siglas en inglés) o midiendo la altura del epitelio y el lumen (MLR/MET, por sus siglas en inglés) (Garmendia et al., 2010; Brooks et al., 2011).

### ***Respuestas fisiológicas***

Un ensayo recomendado es el de respuesta de supervivencia al aire o estrés al estrés (SOS por sus siglas en inglés), el cual se basa en el hecho de que durante la anaerobiosis, aquellos organismos que han estado expuestos a contaminantes mueren más rápidamente (Viarengo et al., 1995; Blaise et al., 2017). Por otro lado, el cálculo de índices de condición es un método sencillo que brinda información sobre el estado fisiológico de los organismos (Blaise et al., 2017). También, la exposición a desorganizadores endocrinos, que alteran los procesos reproductivos, puede inferirse mediante el estudio de los índices gonadales, la

frecuencia de sexos o la presencia de intersexos (Ortiz-Zarragoitia et al., 2011; Davies y Vethaak, 2012; de los Ríos et al., 2013, 2018; Cajaraville et al., 2016).

Además, todos estos biomarcadores pueden ser correlacionados con la salud individual y el potencial reproductivo, lo cual permite luego extrapolaciones a nivel poblacional (de los Ríos et al., 2016a).

### ***Consideraciones sobre los análisis de biomarcadores y respuestas fisiológicas***

En el caso de estudios ambientales, donde en general se encuentra una mezcla de compuestos químicos y diversos factores de estrés, es recomendable incorporar al análisis múltiples biomarcadores y respuestas fisiológicas. Estos deben estudiarse tanto en los organismos que se sospecha han sido expuestos a contaminantes como también en aquellos que habitan en los sitios de “referencia” —sitios ecológicamente idénticos a los ambientes que se sospechan están contaminados excepto por la presencia de los contaminantes—. Así, se obtiene una línea de base para contrastar los valores obtenidos para las diferentes respuestas biológicas estudiadas en organismos expuestos a distintas sustancias. Estos resultados indican los valores de referencia en condiciones fisiológicas normales y brindan una referencia de los niveles de respuesta esperados para cada biomarcador estudiado en un ambiente contaminado. Por otro lado, estos valores de referencia proveen información sobre las variaciones estacionales, propias de la biología de la especie, como cambios metabólicos o reproductivos u otros factores ambientales que pueden afectar la respuesta biológica estudiada (McCarthy y Shugart, 1990).

## **Evaluación del riesgo ambiental**

Dado que la finalidad de los programas integrales de monitoreo es proveer la información necesaria para determinar la calidad del ambiente en base a la presencia de las distintas sustancias en él presentes, se han desarrollado diversos criterios de evaluación. Los sedimentos pueden ser una fuente de contaminación para la biota y potencialmente causarle efectos adversos. Es por ello que los niveles de compuestos orgánicos y metales se pueden comparar con pautas de calidad de sedimentos (SQG, por sus siglas en inglés de *sediment*

*quality guidelines*). Estos pueden tener diferentes nominaciones dependiendo del organismo que lo establece. Por ejemplo, la NOAA los denomina Efecto de Rango Bajo o ERL (por sus siglas en inglés de *effects range low*) y Efecto de Rango Medio o ERM (por sus siglas en inglés de *effects range median*) (Long et al., 2006). La OSPAR los denomina concentraciones base de evaluación o BAC (por sus siglas en inglés de *background assesment concentrations*) y Criterios de Evaluación Ambiental o EAC (por sus siglas en inglés de *environmental assesment criteria*) (Vethaak et al., 2017). Ambos criterios establecen valores de base contra los cuales contrastar las distintas mediciones, respuestas biológicas o biomarcadores para poder entender si se producen efectos deletéreos sobre la biota. Los valores de respuestas menores que los reportados como ERL (o BAC), indicarían que no hay efectos biológicos deletéreos. En cambio, si se encuentran entre los valores ERL y ERM (o BAC y EAC) los efectos biológicos podrían ser deletéreos y si superan el ERM (o EAC) los efectos deletéreos serían altamente probables en el largo plazo (Martínez-Gómez et al., 2017). Además, para facilitar su comprensión y comparación, estos criterios pueden representarse en formato de semáforo de tres colores: azul (<ERL o <BAC), verde (>ERL o <ERM >BAC <EAC), y rojo (>EAC o >ERM). Existen otros criterios en otras regiones marítimas, como los Criterios de Calidad de Sedimentos de Canadá o CSQG (por sus siglas en inglés de *Canadian sediment quality guidelines*) (MacDonald et al., 2004); sin embargo, no hay reportes para especies endémicas de Latinoamérica y mucho menos de Argentina. A pesar de que estos valores puedan servir de guías para otras regiones o especies, se sugiere utilizar un enfoque validado regionalmente para establecer criterios de evaluación específicos (Vethaak et al., 2017).

Por otro lado, el estudio de distintas respuestas biológicas a distintos niveles de organización, puede tornar el análisis un tanto complejo. Es por ello que, para simplificarlo de alguna manera, en los últimos años se han desarrollado índices de salud ambiental. Así, indicadores como el índice de evaluación de bioefectos, usado en peces, o el índice integral de biomarcadores (BAI e IBR por sus siglas en inglés, respectivamente) permiten combinar las distintas respuestas biológicas en un único valor para interpretar y describir los efectos en los organismos, lo cual funciona como una gran herramienta de comparación entre distintas poblaciones (Broeg y Lehtonen, 2006).

## Sobre los objetivos y estructura de esta tesis

El objetivo original de la presente tesis era analizar la aptitud del mejillín *Brachidontes rodriguezii* para ser propuesto como centinela de contaminación en áreas costeras de Argentina evaluando múltiples respuestas biológicas en diferentes niveles de organización y analizando si existían variaciones estacionales. Durante el primer año del desarrollo de la tesis, se presentó la posibilidad de firmar un convenio de doctorado en cotutela internacional entre la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FCEyN-UBA, Argentina) y la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU, España), institución a la que pertenece la Dra. Miren P. Cajaraville, codirectora de beca doctoral (CONICET). Por dicho convenio, esta tesis está inscripta en el doctorado en el área “Ciencias Biológicas”, en la FCEyN-UBA, y también, en el doctorado de “Contaminación y Toxicología Ambientales/Environmental Contamination and Toxicology CTA/ECT” en la UPV/EHU, lo cual permite optar por la doble titulación. La celebración del convenio de cotutela estableció que debía cumplirse con el reglamento de ambas Universidades para los requisitos de la carrera doctoral, y realizarse una estancia de investigación en la Universidad contraparte. Por este motivo, en el año 2021 se llevó a cabo una estancia de 9 meses en el grupo de investigación “Biología Celular en Toxicología Ambiental (CBET)” de la Estación Marina de Plentzia y el Departamento de Zoología y Biología Celular Animal de la UPV/EHU. El objetivo de dicha estancia era trasladar muestras de *B. rodriguezii* para realizar estudios transcriptómicos en la UPV/EHU. Debido a cuestiones logísticas asociadas a la emergencia sanitaria declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) por causa del coronavirus COVID-19, las muestras biológicas no pudieron ser trasladadas. Por ello, se decidió cambiar la especie modelo a *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 para aprender el *know how* del análisis transcriptómico con la intención de, en un futuro, poner en práctica las técnicas aprendidas en *B. rodriguezii*.

Por todo lo anteriormente mencionado, la presente tesis se estructuró en dos secciones, una desarrollada en Argentina — Sección I— y otra en el País Vasco — Sección II. La Sección I, denominada “Enfoque ambiental integrado para evaluar los efectos biológicos

en el mitílido *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846) en tres ambientes costeros con distintos tipos de impacto antrópico en la Provincia de Buenos Aires (Argentina)” consta de 2 capítulos. La Sección II, denominada “Enfoque ambiental integrado para evaluar los efectos biológicos en el mitílido *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 en dos localidades del Golfo de Vizcaya, País Vasco (España)” está conformada por 2 capítulos. En cada sección se detallan los objetivos generales y específicos correspondientes y se discuten los resultados obtenidos. Finalmente, las conclusiones del presente trabajo integran ambas secciones.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la salud ambiental de dos áreas marino-costeras a través de un enfoque integral utilizando dos especies de mitílidos. Evaluar, en las dos especies, las respuestas en diferentes niveles de organización biológica y los efectos fisiológicos causados por la posible contaminación generada por las diferentes actividades de origen antrópico.

## **HIPÓTESIS GENERAL**

Las poblaciones de mitílidos aquí estudiadas están expuestas a la posible contaminación generada por las distintas actividades de origen antrópico y serían bioindicadores y centinelas ideales para estudios de monitoreo ambiental. El estudio integral, que incluye el análisis de los contaminantes, una selección de múltiples biomarcadores y respuestas fisiológicas, permite analizar el estado de salud de los ambientes marino-costeros estudiados.

**SECCIÓN I. Enfoque ambiental integrado para evaluar los efectos biológicos en el mitílido *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846) en tres ambientes costeros con distintos tipos de impacto antrópico en la Provincia de Buenos Aires (Argentina)**

## I.I OBJETIVO

Determinar las variaciones estacionales de los potenciales efectos biológicos en el mitílido *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846) recolectados en tres ambientes costeros de la Provincia de Buenos Aires (Argentina) con distintos tipos de impacto antrópico. Determinar cuáles son las respuestas biológicas más apropiadas para la utilización de esta especie como centinela y bioindicador de contaminación ambiental y evaluar el estado de salud de cada ambiente estudiado.

## I.II OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS ASOCIADAS

1. Objetivo: Determinar la disponibilidad de diferentes contaminantes a lo largo del año en sedimento proveniente de ambientes con distintos tipos de impacto antrópico y su relación con la bioacumulación en el mitílido *Brachidontes rodriguezii*.

Hipótesis: Los sitios de estudio presentan diferentes contaminantes que pueden bioacumularse en individuos de esta especie a lo largo del año.

2. Objetivo: Estudiar, a lo largo del año, biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo y biotransformación en el mitílido *Brachidontes rodriguezii* en ambientes con distintos tipos de impacto antrópico.

Hipótesis: Los distintos tipos de impacto antrópico generan respuestas en las enzimas antioxidantes y detoxificantes en esta especie a lo largo del año.

3. Objetivo: Estudiar, a lo largo del año, la respuesta de distintos biomarcadores celulares y tisulares en el mitílido *Brachidontes rodriguezii* en ambientes con distintos tipos de impacto antrópico.

Hipótesis: Los distintos tipos de impacto antrópico generan respuestas en los biomarcadores celulares y tisulares en esta especie a lo largo del año.

4. Objetivo: Estudiar, a lo largo del año, distintas respuestas fisiológicas en el mitílido *Brachidontes rodriguezii* en ambientes con distintos tipos de impacto antrópico.

Hipótesis: Los distintos tipos de impacto antrópico generan respuestas fisiológicas en la especie utilizada a lo largo del año.

5. Objetivo: Establecer cuáles son las respuestas biológicas más apropiadas para la utilización del mitílido *Brachidontes rodriguezii* como centinela y bioindicador de contaminación ambiental y evaluar el estado de cada ambiente estudiado.

Hipótesis: El uso de un índice integral de respuesta de biomarcadores permite establecer cuáles son las respuestas biológicas más apropiadas en esta especie. Los ambientes más contaminados presentan un índice mayor.

6. Objetivo: Establecer cuál es el periodo más apropiado para aplicar programas de biomonitoreo de contaminación ambiental en Argentina utilizando al mitílido *Brachidontes rodriguezii* como centinela y bioindicador.

Hipótesis: El período más apropiado para aplicar programas de biomonitoreo de contaminación ambiental está determinado por factores como el ciclo reproductivo de la especie utilizada.

El objetivo específico 1 se desarrolla en el Capítulo 1, mientras que los objetivos específicos 2, 3, 4, 5 y 6 en el capítulo 2. Finalmente, ambos capítulos se integran en las Conclusiones.

## I.III INTRODUCCIÓN GENERAL

### El mitílido *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846)

#### Ecología de la especie, hábitat y distribución

Originalmente esta especie fue descrita como *Mytilus rodriguezii* d'Orbigny, 1846. Se han analizado las relaciones filogenéticas de *B. rodriguezii* utilizando principalmente la forma de las valvas para diferenciarlo de otras especies (Trovant et al., 2015, 2016; Márquez et al., 2018) y su clasificación sistemática vigente es la siguiente:

Filo: MOLLUSCA

Clase: Bivalvia

Subclase: Autobranchia

Infraclasse: Pteriomorphia

Orden: Mytilida

Superfamilia: Mytiloidea

Familia: Mytilidae

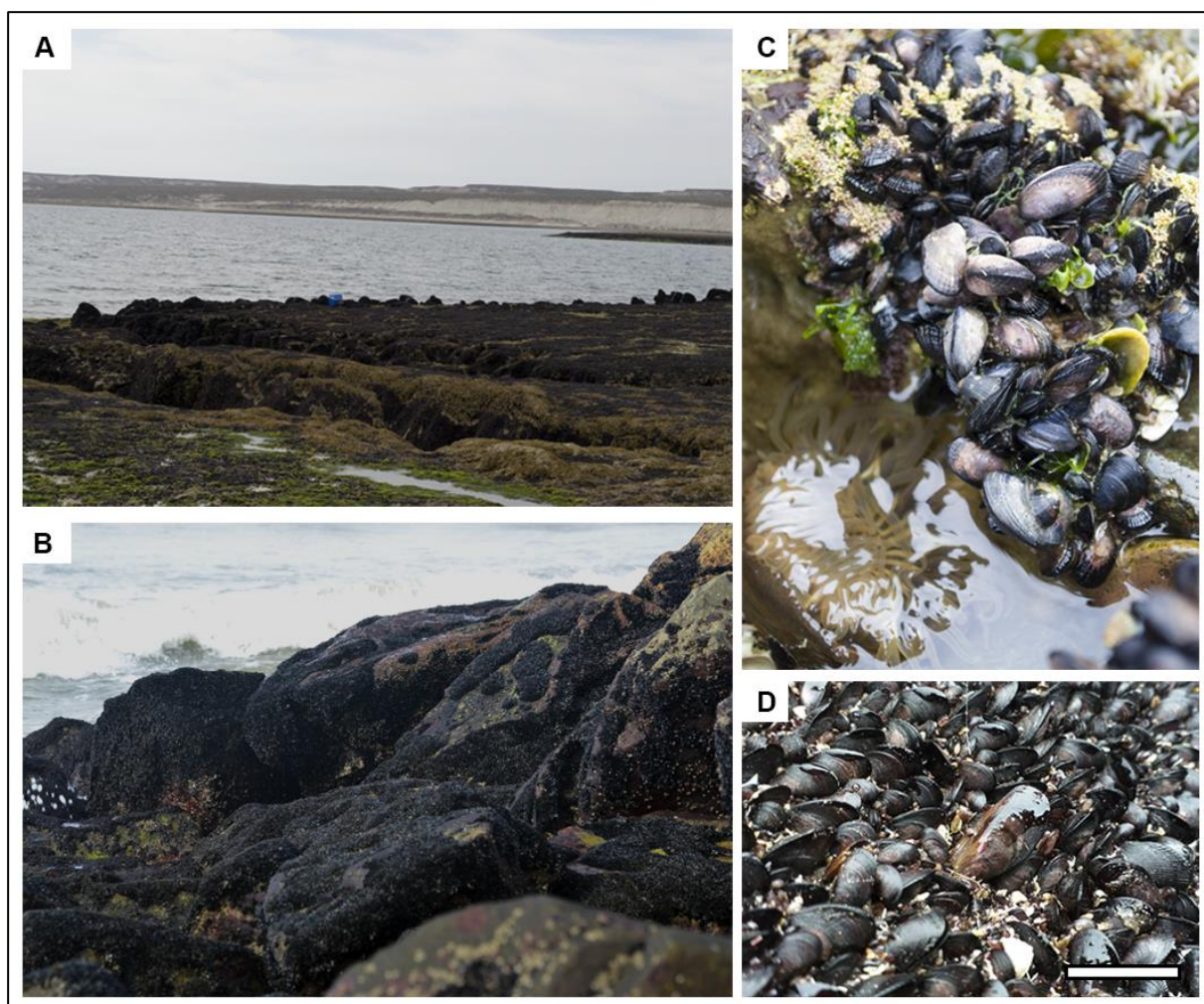
Subfamilia: Brachidontinae

Género: *Brachidontes*

*Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846)

Esta especie, comúnmente llamada mejillín, presenta un pequeño tamaño que puede alcanzar los 55 mm de largo, aunque en promedio no suele superar los 30 mm (Figura I.1). Este bivalvo filtrador se alimenta de algas, particularmente diatomeas y detritos orgánicos (Penchaszadeh, 1973). Es una especie dioica con fecundación externa y una larva velígera libre, nadadora y planctotrófica. Con respecto a su ciclo reproductivo, que ha sido caracterizado en poblaciones de Villa Gesell, Provincia de Buenos Aires, se ha observado un periodo de puesta principal en la primavera y verano austral, registrándose machos y hembras maduros sexualmente a lo largo de todo el año. Esto sugiere la presencia de eventos de

puesta secundarios y un reclutamiento continuo (Torroglosa y Giménez, 2019). La talla de primera madurez se estima en 8,13 mm y 7,05 mm para machos y hembras, respectivamente. Además, se ha reportado que los machos con largo de valva mayor que 14 mm y hembras con largo de valva mayor que 13 mm son maduros sexualmente (Torroglosa y Giménez, 2016).



**Figura I.1.** El mitílido *Brachidontes rodriguezii* en los intermareales de la costa argentina. **A.** Banco de mejillinar sobre la plataforma de abrasión en un intermareal de la provincia de Chubut. **B.** Banco de mejillinar sobre sustrato artificial en un intermareal de la provincia de Buenos Aires. **C.** Comunidad del mejillinar donde se observan distintas especies de algas y macroinvertebrados asociados. **D.** Detalle del mejillinar donde se observa la alta densidad de individuos y el pequeño tamaño de los mismos. Escala 2 cm.

Este molusco es un ingeniero ecosistémico que forma extensos bancos denominados mejillinares (Figura I.1), cuya densidad varía entre 200–800 ind.dm<sup>-2</sup> (Arribas et al., 2015;

Gutiérrez et al., 2015). Estos bancos aumentan la complejidad del hábitat por lo que pueden albergar una gran variedad de especies (Borthagaray y Carranza, 2007). *Brachidontes rodriguezii* posee una amplia distribución en Sudamérica desde Torres, en el sur de Brasil (29°19'36"S, 49°46'03"O) (Agostini y Ozorio, 2018) hasta Caleta Olivia, en el sur de Argentina (47°26'47"S, 67°30'49"O) (Cuevas et al., 2006) (Figura I.2). Es la especie dominante de las costas rocosas de la Provincia de Buenos Aires (Penchaszadeh et al., 2007) e incluso es capaz de colonizar playas arenosas con estructuras artificiales como escolleras y muelles (Scelzo et al., 1996).



**Figura I.2.** Distribución geográfica de *Brachidontes rodriguezii* en Sudamérica. Se encuentra en las costas desde el Sur de Brasil en Torres hasta el sur de Argentina en Caleta Olivia.

Los mejillinares albergan y estructuran las comunidades bentónicas de los intermareales dado que funcionan como trampas de sedimento que modulan las temperaturas extremas y la desecación durante marea baja (Arribas et al., 2013; Gutiérrez et al., 2019). En Argentina, numerosos trabajos han estudiado la estructura de la comunidad asociada a *B. rodriguezii*. Dicha comunidad puede modificarse por diversos motivos como un aumento de materia orgánica disuelta o la disminución de la salinidad (Adami et al., 2004; Elías et al., 2006), por acción del oleaje (Gutiérrez et al., 2015), por la presencia de algas epibiontes (Gutiérrez et al., 2019) o incluso por la cobertura en los bordes o interior de los parches de mejillines (Soria et al., 2022).

### ***Brachidontes rodriguezii* como organismo bioindicador y centinela de contaminación ambiental en Argentina**

El mejillín *B. rodriguezii* reúne muchas de las características deseables previamente mencionadas para especies centinela (Figura 1, Sección General): es un bivalvo filtrador, sésil, abundante, fácil de muestrear y se encuentra ampliamente distribuido en la costa de Argentina. En la Figura 1.3 se resumen los trabajos más relevantes sobre el uso de *B. rodriguezii* como bioindicador o centinela de los últimos 20 años y se detallan los diferentes contaminantes, biomarcadores o respuestas estudiados.

Varios estudios han analizado los cambios en la dinámica poblacional de la especie en función de disturbios de origen antrópico como lo son las plantas de tratamientos de aguas residuales (Garaffo et al., 2018; Cuello et al., 2019; Saracho Bottero et al., 2020; Elías et al., 2022). Las comunidades de los intermareales suelen verse afectadas según su distancia a las plantas de tratamientos de aguas residuales. En la comunidad asociada al mejillinar de la zona del efluente cloacal de Quequén (Provincia de Buenos Aires), se ha observado que la densidad poblacional de *B. rodriguezii* es directamente proporcional a la distancia del efluente dando lugar a la colonización de especies oportunistas (Vallarino et al., 2002). Este mismo patrón fue observado en el efluente de Mar del Plata en la Provincia de Buenos Aires (Elías et al., 2006, 2009). La abundancia de *B. rodriguezii* puede disminuir e incluso estar ausente

en zonas de efluentes altamente contaminadas, lo cual podría deberse a las altas proporciones de partículas en suspensión que interferirían con los procesos de filtración en esta especie (López Gappa et al., 1990). Así, la proporción de mitílidos ha sido propuesta como un método para la evaluación de contaminación orgánica proveniente de plantas de tratamiento en la costa del Atlántico Sur (Vallarino et al., 2002).

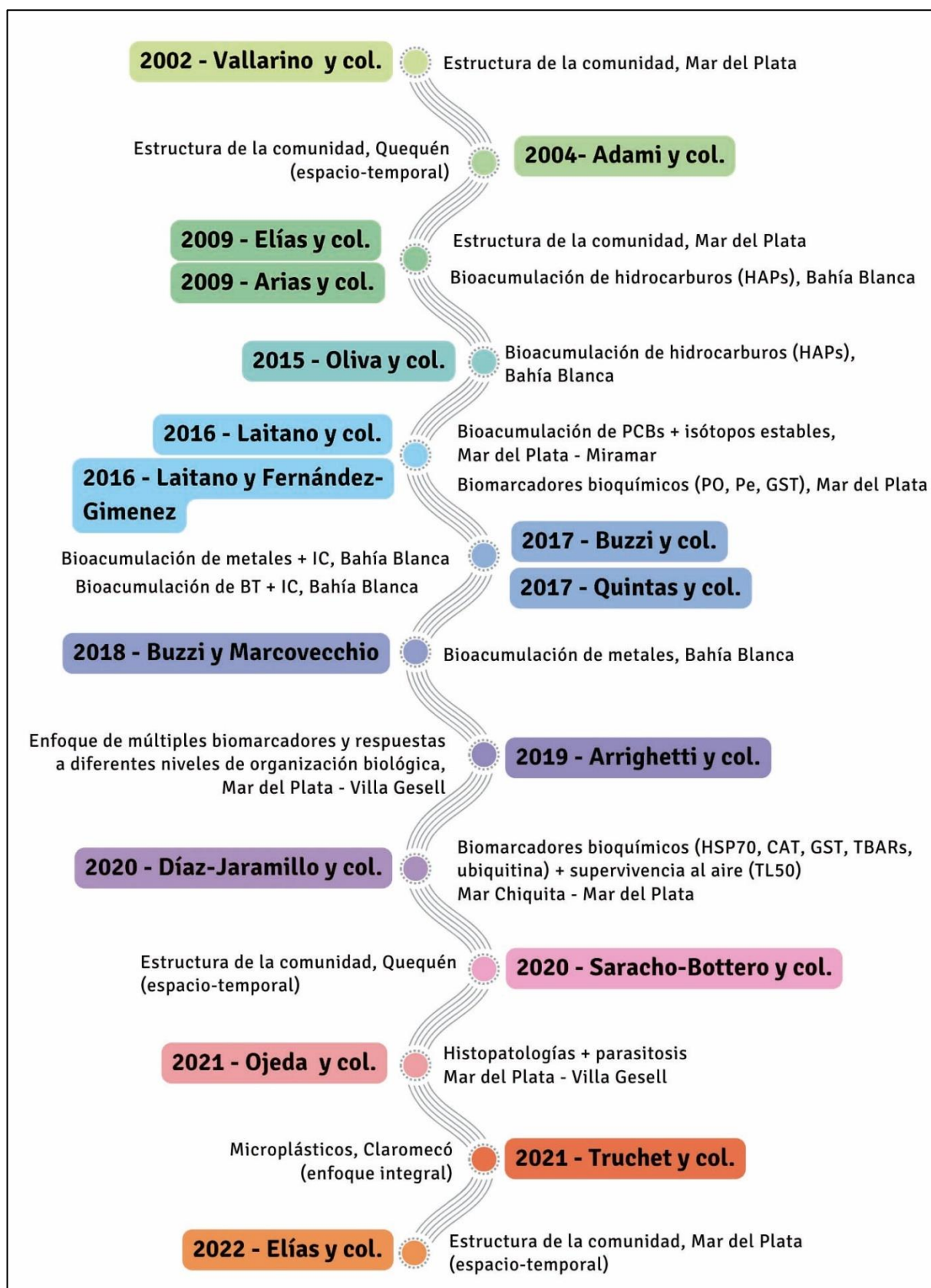
Además, varios estudios han reportado que *B. rodriguezii* posee la capacidad de acumular diferentes compuestos orgánicos persistentes y que dicha capacidad puede verse influenciada tanto por factores bióticos como abióticos. Por ejemplo, se ha observado que la bioacumulación de PCBs en los mejillines de la costa de Mar del Plata puede verse potenciada por el ingreso de materia orgánica proveniente de la escorrentía de los arroyos aledaños (Laitano et al., 2016). En el estuario de Bahía Blanca en la Provincia de Buenos Aires, se ha estudiado la bioacumulación de HAPs en varias oportunidades (Arias et al., 2009; Oliva et al., 2015, 2017) y, de hecho, Oliva y colaboradores han señalado que el mejillín puede ser mejor indicador de contaminación que los sedimentos (Oliva et al., 2015). Estos autores también han analizado la relación entre la acumulación de HAPs y el índice de condición de salud general de los mejillines en diferentes puntos del estuario con distintos impactos antrópicos a lo largo del tiempo (Oliva et al., 2017). Observaron que hubo diferencias entre los índices de condición en distintas estaciones del año pero no así entre los distintos sitios, con lo cual dichas diferencias no podían ser atribuidas a la bioacumulación de HAPs y estarían más bien relacionadas con otros factores, como el ciclo reproductivo de la especie (Oliva et al., 2017). El mismo patrón en el índice de condición de los mejillines del estuario de Bahía Blanca fue observado con respecto a la bioacumulación de butilenos (Quintas et al., 2017). En base a los resultados de los trabajos previamente mencionados, el índice de condición no sería un buen indicador del estado fisiológico de los mejillines en relación a su bioacumulación de compuestos orgánicos persistentes. Sin embargo, al analizar la bioacumulación de metales traza y el índice de condición se ha observado que este disminuye al aumentar la concentración de metales en masa visceral (Buzzi et al., 2017; Buzzi y Marcovecchio, 2018). Por otro lado, al evaluar la acumulación de metales en mejillines y sedimento en relación con distintos índices de acumulación, se ha observado una influencia espacio-temporal en la

bioacumulación en los mejillines, la cual es mayor en las temporadas de verano que de invierno (Buzzi et al., 2017).

A nivel de biomarcadores, se ha comparado bioquímicamente la actividad de enzimas inmunológicas como las fenoloxidasas y peroxidasas, y la actividad de la enzima de biotransformación de fase II, glutatión-S-transferasa (GST) en *B. rodriguezii* y en otros invertebrados (*Balanus glandula* y *Siphonaria lessonii*) en relación con la contaminación de la zona portuaria de Mar del Plata (Laitano y Fernández-Gimenez, 2016). Se observó que el mejillín presentaba únicamente diferencias en la actividad de la enzima GST, y los autores advierten que la selección de la especie bioindicadora es crucial ya que no todos los organismos pueden reflejar los efectos de la contaminación crónica a través de cualquiera de sus respuestas bioquímicas (Laitano y Fernández-Gimenez, 2016). Además, en esta especie se ha evaluado la respuesta de ciertas enzimas (entre ellas GST) al estrés térmico en distintos escenarios ambientales, aunque su relación no ha sido muy clara (Díaz-Jaramillo et al., 2020).

Son escasos los estudios sobre las alteraciones histopatológicas en *B. rodriguezii* (Arrighetti et al., 2019; Ojeda et al., 2021). Recientemente, se ha estudiado la parasitosis y sus consecuentes alteraciones histopatológicas en los mejillines que habitan en el puerto de Mar del Plata, y otros sitios con distinto tipo de impacto de origen antrópico en la Provincia de Buenos Aires, y se han brindado los primeros registros de prevalencia de ciertos parásitos para esta especie (Ojeda et al., 2021). Arrighetti y colaboradores han analizado diversas alteraciones histopatológicas y han aplicado un enfoque de múltiples biomarcadores de contaminación demostrando que la especie es sensible a varios biomarcadores de contaminación ambiental (Arrighetti et al., 2019). Sin embargo, no se cuenta con información sobre las posibles variaciones estacionales de los distintos biomarcadores para la especie. Además, los estudios estacionales se han enfocado en uno o dos niveles de organización biológica, principalmente en la estructura de la comunidad asociada al mejillinar (Adami et al., 2004; Elías et al., 2009, 2022; Saracho Bottero et al., 2020). Asimismo, son pocos los estudios integrales de contaminación, al igual que los análisis de acumulación de contaminantes de preocupación emergente como son los microplásticos (Truchet et al., 2021). Otro de los problemas en Argentina es que no se cuenta con información sobre los valores base de

biomarcadores y respuestas fisiológicas en esta especie, ni de mitílidos en general, a pesar de ser modelos globalmente utilizados. Este problema es propio de la región, ya que en Sudamérica prácticamente no existen legislaciones sobre los valores de los niveles de contaminantes en sedimento o biota. Es por esto que todos los trabajos de la región suelen tomar como referencias los valores guía internacionales de organismos como la UNEP o ICES, entre otros.



**Figura I.3.** Antecedentes de los últimos 20 años sobre el uso de *Brachidontes rodriguezii* en estudios de contaminación ambiental en Argentina. BT: butilestaño; CAT: catalasa; col.: colaboradores; GST: glutatión-S-transferasa; HAPs: hidrocarburos aromáticos policíclicos; HSP70: proteína de choque térmico 70; IC: índice de condición; PCBs: policlorobifenilos; Pe: peroxidasas; PO: fenoloxidasas; TBARs: ácido tiobarbitúrico; TL<sub>50</sub>: tiempo letal 50.

## I.IV METODOLOGÍA GENERAL

### Sitios de estudio

La Provincia de Buenos Aires se encuentra en la región este de Argentina (América del Sur), en el Mar Argentino del Océano Atlántico. En la costa de la Provincia de Buenos Aires, alrededor de Mar del Plata, el régimen de mareas es mixto, preponderantemente semidiurno y presenta una amplitud media de 0,79 m (Servicio de Hidrografía Naval <http://www.hidro.gob.ar>). Dentro de las características físico-químicas, la temperatura superficial del agua varía entre 9,3 y 21 °C, la salinidad entre 33,3 y 33,8 ups (Guerrero y Piola, 1997; Lucas et al., 2005) y el pH se encuentra entre 7 y 8,5 (Isla et al., 1998). La deriva costera tiene un sentido predominante de sur a norte (Isla et al., 2006).

El área de este estudio comprendió dos sitios con mayor impacto antrópico ubicados en el Partido de General Pueyrredón (PC: Planta Camet y PMdP: Puerto Mar del Plata) y un tercer sitio de menor impacto (PB: Playa Brusquitas), ubicado en el Partido de General Alvarado, en la costa de la Provincia de Buenos Aires, Argentina (Figura I.4).

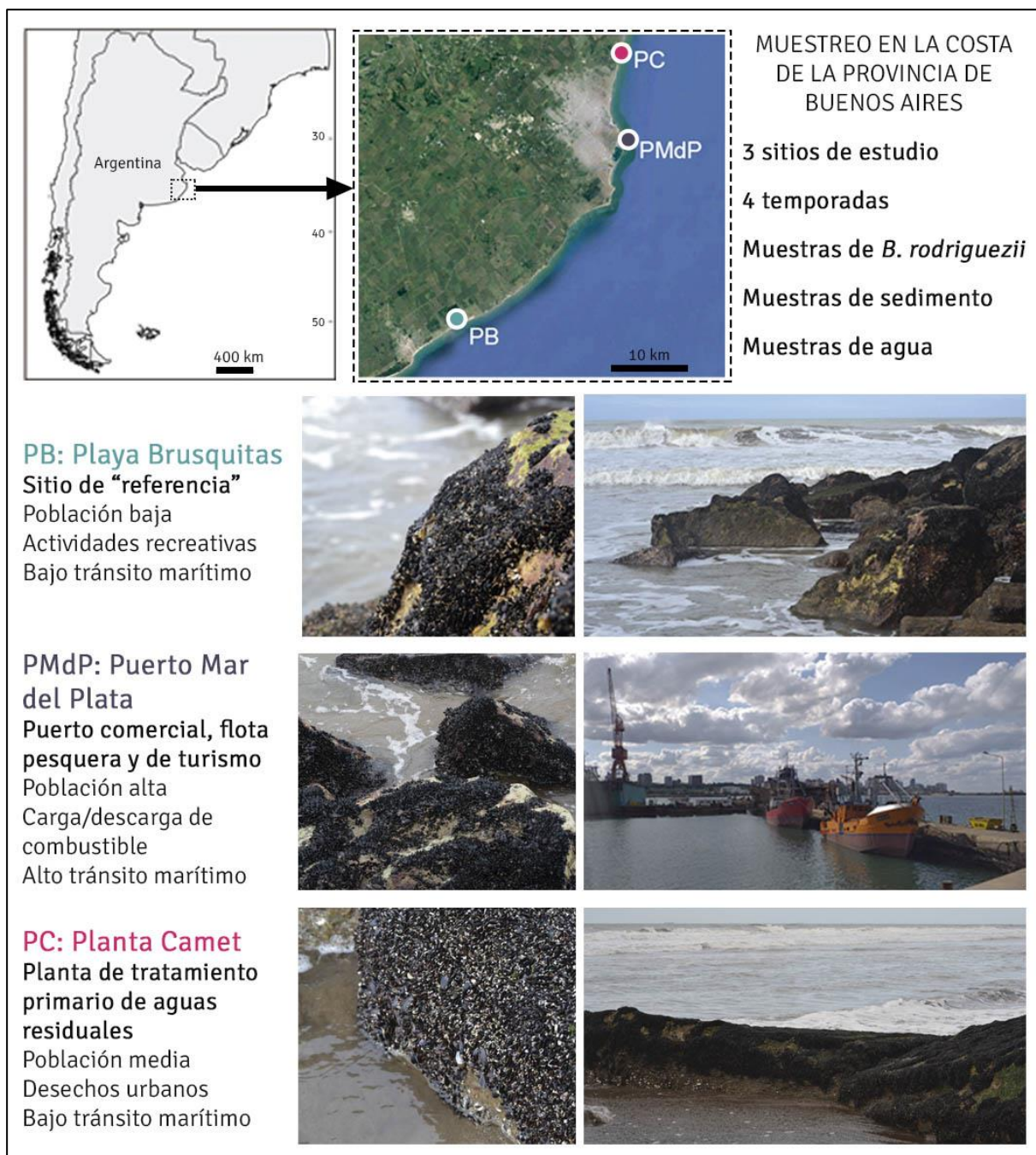
El primer sitio del Partido de General Pueyrredón, se encuentra en la playa Las Delicias en la localidad de Camet. Esta localidad comprende los barrios de Aeropuerto, Barrio Parque Félix Camet y Lomas de Camet y cuenta con 8458 habitantes (INDEC, 2001). Los principales atractivos de la zona de Camet son el Parque Camet, un predio de 139 ha. donde se realizan actividades de esparcimiento y de práctica de deportes, y las playas cuyo uso también es recreativo. El tránsito marítimo es bajo en la zona y el sitio de muestreo de Planta Camet (PC, 37°56'06,4"S, 57°31'51,8"O) se encuentra, aproximadamente a 1,2 km al sur de la Planta de Pretratamiento de aguas residuales que recoge los residuos cloacales del partido de General Pueyrredón. Dicha planta, cuenta desde el año 2014 con un emisario submarino de 4 km de longitud y 2 m de ancho que descarga las aguas residuales directamente al submareal a través de difusores (a 4 km mar adentro de la línea de costa). Desde agosto de 2018 funciona, además, una nueva Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR), la cual realiza la extracción y gestión de sólidos, arenas, grasas y aceites del efluente cloacal, para que luego

el emisario submarino realice la descarga al medio marino (OSSE, 2020; Miglioranza, 2021). En el partido de General Pueyrredón, se registran aproximadamente 618989 habitantes (INDEC, 2010), pero al contar con la ciudad balnearia más importante del país —Mar del Plata— recibe alrededor de 3 millones de turistas en la temporada de verano (diciembre a marzo) (Bouvet et al., 2005). Así, hay una marcada estacionalidad en las descargas de sus efluentes, que está ligada principalmente a las temporadas altas de turismo variando entre un caudal diario de  $2,8 \text{ m}^3.\text{seg}^{-1}$  en invierno y  $3,5 \text{ m}^3.\text{seg}^{-1}$  en verano (Scagliola y Furchi, 2006). Los principales estudios realizados en la zona corresponden a investigaciones sobre la descarga de los efluentes cloacales y el efecto sobre la comunidad asociada al mejillinar o la comunidad bentónica del intermareal antes, durante o después de la creación del emisario submarino (Elías et al., 2003, 2004, 2006, 2009, 2022; Garaffo et al., 2018; Cuello et al., 2019; Llanos et al., 2021). También se ha estudiado la contribución del uso de pesticidas en las zonas aledañas (Miglioranza et al., 2004). Por todos estos motivos, este sitio ha sido considerado como un lugar de alto impacto antrópico.

El segundo sitio, aproximadamente a 10 km al sur de PC, se encuentra en el puerto de la ciudad de Mar del Plata. Se trata de un puerto marítimo artificial dividido en tres áreas: comercial, industrial y operativa, y dos sectores diferenciados por la presencia de dos escolleras principales: escollera sur (2750 m de largo) y escollera norte (1050 m de largo). El sector sur tiene carácter comercial y cuenta con tres dársenas y una posta de inflamables destinada a las operaciones de buques con gas licuado de petróleo. Por otro lado, el sector norte cuenta con un muelle de pasajeros, una dársena militar para submarinos y un fondeadero para naves deportivas. Se trata de un puerto principalmente pesquero, pero donde también se desarrollan actividades de transporte de petróleo y cereales. El puerto es también un atractivo turístico por estar arraigado a la historia de la ciudad y contar con una reserva de lobos marinos de un pelo, especie declarada monumento natural de la Ciudad de Mar del Plata en 1994. Además, ha sido designado como estación terminal de cruceros internacionales por la Asociación de Cruceros del Cono Sur, con lo cual cruceros internacionales con turistas pueden recalar en la ciudad balnearia de Mar del Plata. El sitio de muestreo se ubica en la escollera sur del puerto de Mar del Plata (PMdP,  $38^{\circ}02'30,3''\text{S}$ ,

57°31'28,7"O), a aproximadamente 200 m de la reserva de lobos marinos del Puerto de Mar del Plata. A la fecha, son varios los estudios que se han hecho en relación con la contaminación dentro de la zona del puerto sobre distintas especies que allí habitan (Rivero et al., 2005; Albano y Obenat, 2009; Nuñez et al., 2012; Albano et al., 2013; Laitano et al., 2015; Laitano y Fernández-Gimenez, 2016). Por estos motivos, este sitio ha sido considerado como un lugar de alto impacto antrópico.

Por último, se incluyó un tercer sitio a 50 km al sur de la ciudad de Mar del Plata en el balneario Las Brusquitas, perteneciente al partido de General Alvarado y ubicado en el barrio Copacabana, en la ciudad de Miramar. Si bien la población de Miramar es de aproximadamente de 30100 habitantes (INDEC, 2010), el sitio de estudio, playa Las Brusquitas (PB, 38°14'50,8"S 57°46'49,3"O), se encuentra en el límite entre General Alvarado y General Pueyrredón, en una zona poco urbanizada y principalmente rural. Dicho sitio, no cuenta con industrias asociadas y es una zona balnearia utilizada principalmente para actividades recreativas durante el verano. Allí, se ha estudiado el uso de pesticidas en el arroyo Las Brusquitas que desemboca en la costa (Miglioranza et al., 2004) y más recientemente la influencia de distintas actividades humanas sobre el arroyo (De Marco et al., 2020). La mayoría de los trabajos del área corresponde a estudios sobre la ecología de la especie *B. rodriguezii* (Gutiérrez et al., 2018, 2019; Gonzalez et al., 2021; Soria et al., 2022) . Por este motivo, este sitio ha sido considerado como un lugar de bajo impacto antrópico en el presente trabajo y utilizado como sitio de “referencia”.



**Figura I.4.** Sitios de estudio en la costa de la provincia de Buenos Aires y características generales del muestreo realizado.

## Muestreos

Los muestreos fueron realizados aleatoriamente en el intermareal rocoso de PB, PC Y PMdP durante marea baja en las cuatro temporadas del año: otoño (abril 2018), invierno (agosto 2018), primavera (noviembre 2018) y verano (marzo 2019). Para simplificar los gráficos y el análisis de los resultados se llamará a cada temporada: otoño, invierno, primavera y verano. Se recolectaron ejemplares del mitílido *B. rodriguezii*, 1 muestra de sedimento

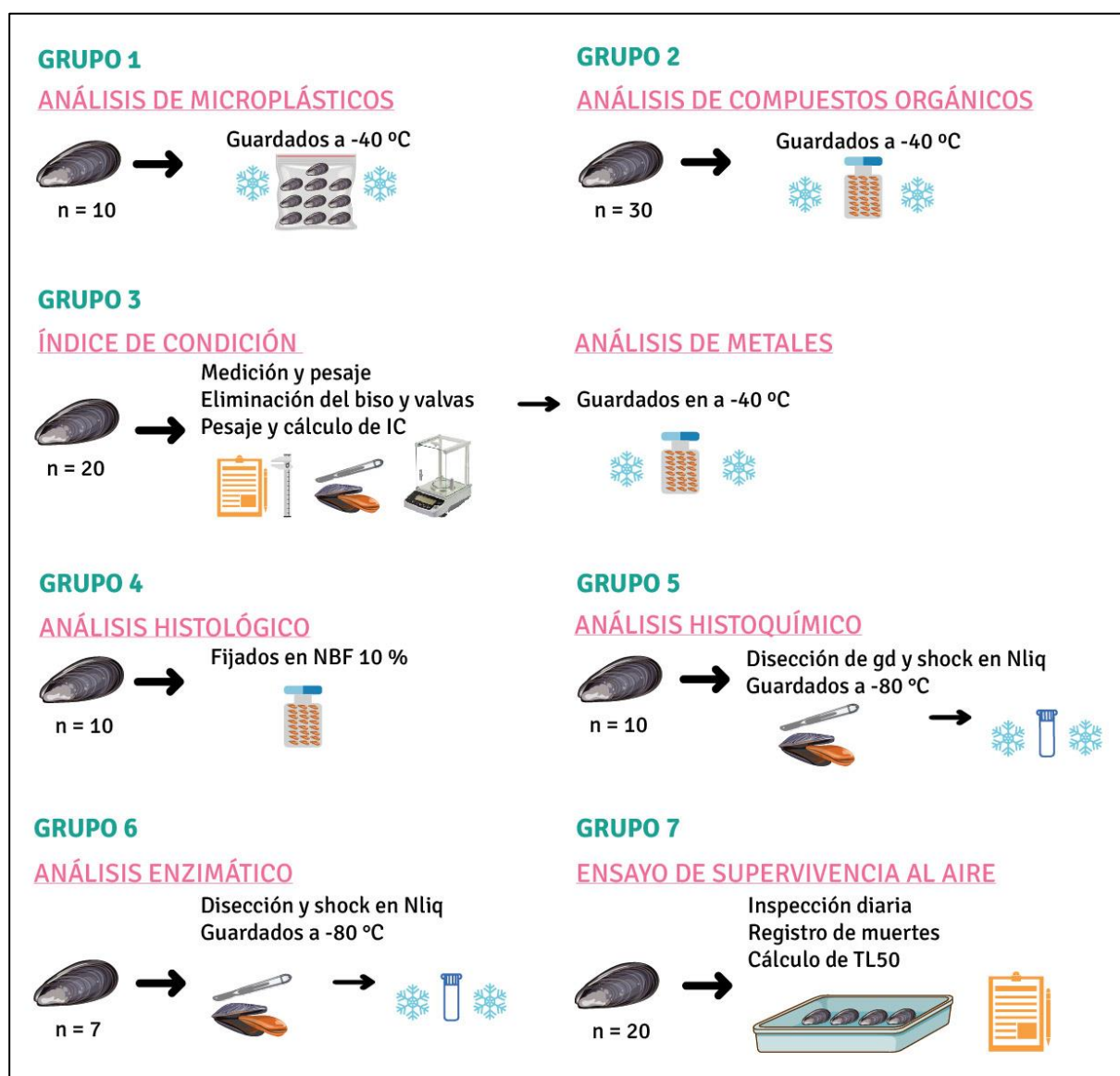
superficial (hasta 5 cm de profundidad, 100 mL aprox.), y 1 muestra de agua marina superficial (500 mL aprox.) de los tres sitios, durante las cuatro temporadas del año (Figura I.4). Los mejillines se extrajeron como distintos parches del intermareal, durante marea baja con una espátula y aleatoriamente. En las campañas de invierno y primavera se encontró muy poca cantidad de sedimento superficial en PMdP por lo que no fue posible llegar al volumen final establecido. Además, en cada sitio se registraron datos físico-ambientales como temperatura del agua, salinidad y pH con un sensor multiparamétrico (Water Quality Meter 850081, Sper Scientific). Los ejemplares de *B. rodriguezii* fueron trasladados inmediatamente en agua marina al laboratorio para su procesamiento. Las muestras de sedimento fueron conservadas a -20 °C.

## Procesado de muestras

Una vez en el laboratorio, en cada sitio y en cada temporada, los animales fueron medidos en largo de valva con un calibre de precisión (0,01 mm) y se seleccionaron únicamente los individuos sexualmente maduros correspondientes a una talla mayor que 8,13 mm de la largo (Torroglosa y Giménez, 2016). Luego, los individuos fueron divididos en 7 grupos para ser disecados, procesados, fijados y almacenados según correspondía para el tipo de respuesta o análisis a realizar (Figura I.5).

Básicamente, para las determinaciones de presencia de microplásticos (n = 10, Grupo 1), las determinaciones analíticas de compuestos orgánicos (n = 30, Grupo 2) y metales (n = 20, Grupo 3), los individuos fueron conservados a -40 °C hasta su análisis. Para los estudios histológicos (n = 10, Grupo 4), los ejemplares fueron fijados en formaldehído neutralizado en *buffer* 10 % (NBF 10 %). Para los análisis histoquímicos, se disecaron pequeñas porciones de la glándula digestiva (n = 10, Grupo 5) que fueron criopreservadas en nitrógeno líquido y luego conservadas a -80 °C. Para las determinaciones enzimáticas (n = 7, Grupo 6), los ejemplares enteros fueron criopreservados en nitrógeno líquido y luego conservadas a -40 °C. Por último, 20 ejemplares fueron utilizados para el ensayo de supervivencia al aire (Grupo 7). Los protocolos de todos los análisis previamente mencionados

se detallan en la sección Materiales y Métodos de cada capítulo de esta Sección I y en el Anexo.



**Figura I.5.** Resumen del procesado de muestras de *Brachidontes rodriguezii* en diferentes grupos según los distintos análisis realizados. El n indicado corresponde al número de individuos de cada sitio de estudio en cada temporada. gd: glándula digestiva; IC: índice de condición; NBF: formaldehído neutralizado en *buffer*; Nliq: nitrógeno líquido; TL50: tiempo letal 50.

## Análisis estadísticos

Para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los distintos resultados, en todas las pruebas estadísticas realizadas se consideraron los factores sitio y temporada. Antes de realizar cualquier prueba estadística se

verificaron los supuestos (normalidad y homocedasticidad) correspondientes al análisis estadístico que se pretendía usar. En caso de no cumplirse los supuestos del modelo a utilizar, los datos fueron transformados y si aún no se cumplían, fueron evaluados a través de análisis no paramétricos. Para todos los análisis se estableció un nivel de significancia del 95 % ( $p < 0,05$ ) y se utilizó el programa STATISTICA 13 (StatSoft, Inc.). El tipo de prueba estadística realizada para cada análisis y conjunto de datos se detalla en la sección Materiales y Métodos de cada capítulo.

**CAPÍTULO 1. Presencia de contaminantes en *Brachidontes rodriguezii* en ambientes con distinto impacto antrópico a lo largo del año**

## 1.1 MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1.1 Factores ambientales

En cada sitio y temporada se registraron datos físico-ambientales como temperatura del agua, salinidad y pH mediante el uso de un sensor multiparamétrico (Water Quality Meter 850081, Sper Scientific).

### 1.1.2 Compuestos orgánicos y metales traza en sedimentos

Las determinaciones de hidrocarburos alifáticos (HAs), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y metales traza en sedimento, se realizaron en colaboración con la Dra. Natalia Cappelletti en el Departamento de Ambiente y Turismo de la Universidad Nacional de Avellaneda (UNDAV). Para ello, las muestras de sedimento, de cada sitio y temporada, se homogenizaron y se separaron en submuestras para la determinación de humedad (24 h a 90 °C), materia orgánica, análisis de compuestos orgánicos y de metales traza. La determinación de materia orgánica se calculó como el porcentaje de la pérdida de peso por combustión a 450 °C durante 8 h.

Para el análisis de HAs y HAPs se tomaron submuestras de sedimentos húmedos (50-70 g) que fueron secadas en una estufa a 30 °C, se enriquecieron con estándares de recuperación (1-Clorooctadecano y o-Terfenilo; Restek 31479) y fueron extraídas mediante ultrasonificación (3 ciclos de 15 minutos) con una mezcla de éter de petróleo: diclorometano. Los extractos obtenidos se concentraron bajo flujo de nitrógeno y purificaron y fraccionaron por cromatografía sobre gel de sílice. Posteriormente, las fracciones que contenían los n-alcenos (F1) e hidrocarburos aromáticos (F2) se concentraron y analizaron por cromatografía gaseosa de alta resolución acoplada a un detector de ionización por llama (Thermo Ultra Trace). La cuantificación fue realizada mediante el uso de estándares certificados de 31 hidrocarburos alifáticos (n-C10 a n-C38 más pristano y fitano; AccuStandard Inc.) y 24 hidrocarburos aromáticos (Standard Reference Material NIST 2260). Para asegurar la calidad, se realizaron blancos de procedimiento cada ocho muestras, verificando la ausencia de

interferencias. La recuperación de n-alcanos e hidrocarburos aromáticos promedió entre 70 y 90 %. Los límites de detección fueron estimados como 3 veces la relación señal/ruido y oscilaron entre 1,0 y 5,0 ng/g para los hidrocarburos individuales. Los resultados se expresaron como ng/g peso seco (ng/g ps).

En las submuestras destinadas al análisis de metales, se realizó una digestión con ácido nítrico (1+1) y ácido clorhídrico (1+1). Se analizó la presencia de cadmio (Cd), níquel (Ni), plomo (Pb) y zinc (Zn) mediante espectrometría de absorción atómica utilizando un equipo Thermo iCE 3000 Series con llama de aire-acetileno, corrección de *background*, y estándares de alta pureza Chem-Lab ®. Los resultados se expresaron como µg/g peso seco (µg/g ps).

Con el fin de poder evaluar los potenciales efectos biológicos adversos de los HAPs prioritarios individuales,  $\Sigma$ HAPs prioritarios y metales presentes en los sedimentos, se utilizó la Guía de Calidad de Sedimentos (SQG) descrita por Long y colaboradores (2006). En esta clasificación se usan valores de referencia denominados Efecto de Rango Bajo (ERL) y Efecto de Rango Medio (ERM) en donde: si la concentración del contaminante es  $< \text{ERL}$  los efectos adversos son raramente observados; si está entre el ERL y ERM los efectos adversos son ocasionalmente observados y si es  $> \text{ERM}$  los efectos adversos son frecuentemente observados. El potencial del contaminante para causar efectos biológicos adversos se evaluó a través de la estimación de los Cocientes Guía de Calidad de Sedimentos (SQG-Qs) como la relación entre la concentración del contaminante y su respectivo ERM. Finalmente, los sedimentos de ambos sitios fueron categorizados según su riesgo toxicológico para cada tipo de contaminante de la siguiente manera:  $\text{SQG-Q} < 0,1$  = sedimento no impactado;  $\text{SQG-Q } 0,1-1$  = sedimento moderadamente impactado;  $\text{SQG-Q} > 1$  = sedimento altamente impactado (MacDonald et al., 2004). Para poder realizar estos cálculos y simplificar el análisis, para cada sitio se calculó la mediana de cada contaminante entre temporadas.

### 1.1.3 Compuestos orgánicos y metales traza en mejillines

Las determinaciones de HAs, HAPs y metales traza en masa visceral de *B. rodriguezii* se realizaron en colaboración con la Dra. Natalia Cappelletti en el Departamento de Ambiente y Turismo de la Universidad Nacional de Avellaneda (UNDAV).

Para el análisis de HAs y HAPs se utilizaron, para cada sitio y temporada, *pools* de 30 individuos de *B. rodriguezii* (Grupo 2) que fueron descongelados y disecados bajo condiciones libre de contaminación. Las determinaciones se realizaron siguiendo la misma metodología que para sedimentos, pero a partir de una submuestra de 5 g de masa visceral. Los resultados se expresaron como ng/g peso seco (ng/g ps).

Para el análisis de los metales, se utilizaron de cada sitio y temporada, *pools* de 20 individuos de *B. rodriguezii* que habían sido previamente disecados para la determinación del índice de condición y que se hallaban preservados a -40 °C (Grupo 3). Se determinaron las concentraciones de cadmio (Cd), cromo (Cr), níquel (Ni), plomo (Pb) y zinc (Zn) por espectrometría de absorción atómica utilizando un equipo Thermo iCE 3000 series con llama de aire-acetileno, corrección de *background*, y estándares de alta pureza Chem-Lab ®. Los resultados se expresaron como µg/g peso seco (µg/g ps).

### 1.1.4 Evaluación del origen de compuestos orgánicos

#### Evaluación del origen de los hidrocarburos alifáticos

Con el fin de evaluar el posible origen (*i.e* antropogénico o biogénico) de los HAs presentes en los sedimentos y mejillines de los sitios de estudio a lo largo de las distintas temporadas, se calcularon 8 índices de evaluación de acuerdo a Commendatore y colaboradores (2000). Como fuentes de origen antropogénico podemos considerar al petróleo o materia orgánica reciclada de diferentes orígenes (lixiviados, aguas residuales, efluentes de plantas de tratamiento). Las fuentes de origen biogénico pueden ser algas, plancton, plantas, animales, plantas vasculares terrestres y bacterias. Los índices calculados fueron los siguientes (las siglas derivan de su término en inglés):

- Hidrocarburo principal (MH): concentración más alta de n-alcano.

- Hidrocarburos de bajo/alto peso molecular (LMW/HMW): relación entre la sumatoria de n-alcanos  $\leq C_{20}$  y la sumatoria de n-alcanos  $\geq C_{21}$ . Valores cercanos a 1 fueron reportados para algas, plancton y petróleo y  $<1$  para bacterias sedimentarias, animales marinos y plantas superiores.
- Relación n-C16: relación entre la suma de todos los n-alcanos y los alcanos n-C16.
- Relación Pristano/Fitano (Pri/Phy): valores cercanos a 1 indican hidrocarburos derivados del petróleo y valores mayores indican hidrocarburos biogénicos.
- Índice de preferencia de carbono (CPI): relación entre distintos hidrocarburos  $2(C_{27} + C_{29}) / C_{26} + (2C_{28}) + C_{30}$ .
- Relación par/impar (Par/impar): proporción de alcanos de cadena par e impar.
- n-C17/Pristano (n-C17/Pri) y n-C18/Fitano (n-C18/Phy): relación entre los alcanos n-C17 y el pristano y relación entre los alcanos n-C18 y el fitano. Indica la presencia de aceites y su biodegradación. Valores bajos sugieren alta degradación, mientras que valores altos indican baja degradación.

### **Evaluación del origen de los hidrocarburos aromáticos policíclicos**

Con el fin de evaluar el posible origen (*i.e* pirolítico o petrogénico) de los HAPs presentes en los sedimentos y mejillín de los sitios de estudio a lo largo de las distintas temporadas, se calcularon tres índices de evaluación de acuerdo a Yunker y colaboradores (2002):

- Benzo(a)antraceno/(benzo(a)antraceno + criseno) (BaA/228): valores menores que 0,2 se atribuyen a fuentes petrogénicas, mayores que 0,35 indican origen pirolítico, mientras que valores entre 0,2 y 0,35 indican un origen mixto.
- Fluoranteno/(fluoranteno + pireno) (Fl/(Fl + Py)): valores menores que 0,4 se atribuyen a fuentes petrogénicas, mayores que 0,5 a la combustión de maderas mientras que valores intermedios a la combustión de petróleo.
- Antraceno/(antraceno + fenantreno) (Ant/(Ant + Phe): valores menores que 0,1 se atribuyen a fuentes petrogénicas, mayores que 0,1 indican combustión.

### 1.1.5 Compuestos orgánicos y metales traza en agua

Las determinaciones analíticas en las muestras de agua no pudieron realizarse debido a que algunas muestras se descongelaron durante el periodo de cuarentena por COVID-19, en el cual el acceso al MACN estaba restringido. Además, en base a los resultados obtenidos en las determinaciones a partir de las muestras de sedimento, se llegó a la conclusión que el volumen de las muestras de agua con las que se contaban no era suficiente.

### 1.1.6 Microplásticos en mejillines

La presencia de microplásticos en la masa visceral de *B. rodriguezii* se analizó en base al protocolo estandarizado recomendado por *JPI Oceans* (Bessa et al., 2019) con pequeñas modificaciones (ver Anexo). Para ello, se tomaron todas las precauciones necesarias en la manipulación del material desde su recolección hasta su análisis, como así también se realizaron todos los controles necesarios. Los mejillines del Grupo 1 (n = 10 por sitio y en cada temporada) fueron descongelados a temperatura ambiente en un recipiente tapado y tratados individualmente a lo largo de todo el protocolo. Una vez descongelados, se los lavó con agua destilada filtrada, se midió el largo de la valva con un calibre de precisión (0,01 mm) y con un bisturí se eliminó el biso y separó la masa visceral de las valvas. Se registró el peso de cada ejemplar antes y después de disecarlos utilizando una balanza de precisión (0,01 g) (Denver Instrument APX-200). Posteriormente, cada individuo fue introducido en un vial con una solución de 10% de hidróxido de potasio (KOH) para su digestión (20 mL de solución de KOH por gramo de masa visceral). La digestión alcalina se realizó a temperatura ambiente durante 48h. La solución de digestión fue filtrada en vacío con filtros reticulados de nitrato de celulosa de 1,2 µm (Microclar®) que luego fueron guardados en placas de Petri de vidrio hasta su inspección. Cada filtro fue pesado antes y después de la filtración para calcular la eficiencia de la digestión como el porcentaje de masa visceral luego de la filtración de acuerdo a la ecuación I.1 (Dehaut et al., 2016). Se aceptó una eficiencia de digestión de entre el 98 y 100 %.

$$Ed \% = 100 - \left( \frac{P_{fd} - P_f}{P_t} \right) \times 100\% \quad (\text{Ecuación I.1})$$

Donde:

Pfd: peso del filtro cubierto por materia orgánica y residuos luego de la digestión

Pf: peso del filtro cubierto por materia orgánica y residuos antes de la digestión

Pt: peso de masa visceral antes de la digestión

La inspección visual de los filtros se realizó utilizando un estereomicroscopio (Leica MZ9 5) y se registró tipo y color de cada elemento observado. Los resultados de abundancia de microplásticos fueron expresados como ítems/individuo e ítems/g de peso húmedo de masa visceral (ítems/g ph)  $\pm$  el error estándar (EE).

### 1.1.7 Análisis estadísticos

Para las determinaciones analíticas de compuestos orgánicos y metales traza en sedimento y masa visceral de mejillín, no se realizaron pruebas estadísticas de los resultados obtenidos por no contarse con réplicas de las muestras analizadas.

La abundancia de microplásticos (MP) (ítems/individuo e ítems/g de masa visceral) fue analizada mediante un análisis de la varianza de 2 factores (ANOVA 2 vías) con el fin de determinar el efecto del sitio, temporada y su interacción (sitio x temporada). Luego, se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para determinar las diferencias entre sitios y entre temporadas. Se verificó previamente el cumplimiento de los supuestos de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad mediante la prueba de Levene. En caso de no cumplirse los supuestos, se aplicó la prueba equivalente no paramétrica (Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples por pares de mediana). Para los análisis estadísticos se estableció un nivel de significancia del 95 % ( $p < 0,05$ ) y se utilizó el programa STATISTICA 13 (StatSoft, Inc.).

## 1.2 RESULTADOS

### 1.2.1 Factores ambientales

La temperatura del agua varió entre los 9,9 y 24,8 °C a lo largo de las distintas temporadas (Tabla I.1). La salinidad se encontró entre los 32,8 y 34 ups (unidades prácticas de salinidad) y el pH del agua entre 8,23 y 8,5 (Tabla I.1). Si bien en varias ocasiones no fue posible determinar algunos parámetros debido a problemas con el instrumental en el campo, no se observaron variaciones entre los valores de los sitios en cada temporada estudiada, excepto para la temperatura, donde se observaron los mayores valores en otoño y los menores en invierno.

**Tabla I.1.** Datos de temperatura (°C), salinidad (ups) y pH del agua registrados en los distintos sitios de estudio a lo largo de las temporadas.

| TEMPORADA | SITIO | TEMPERATURA (°C) | SALINIDAD (UPS) | pH   |
|-----------|-------|------------------|-----------------|------|
| Otoño     | PB    | 24,8             | s.r             | s.r  |
|           | PC    | s.r.             | s.r             | s.r  |
|           | PMdP  | s.r.             | s.r             | s.r  |
| Invierno  | PB    | 13,6             | 33              | 8,46 |
|           | PC    | 9,9              | 33,3            | 8,48 |
|           | PMdP  | 10,6             | 33              | 8,23 |
| Primavera | PB    | 18               | s.r             | 8,27 |
|           | PC    | s.r.             | s.r             | s.r  |
|           | PMdP  | 18,8             | 32,8            | 8,5  |
| Verano    | PB    | 20               | 34              | s.r  |
|           | PC    | 21               | 34              | s.r  |
|           | PMdP  | 22               | 34              | s.r  |

s.r: sin registro. PB: Playa Brusquitas, PC: Planta Camet, PMdP: Puerto Mar del Plata

### 1.2.2 Compuestos orgánicos y metales traza en sedimento

#### Contenido de materia orgánica en sedimento

El porcentaje de materia orgánica (%MO) de las muestras de sedimento analizadas se detalla en la Tabla I.2. En general se encontraron valores bajos (0,39 y 1,37 %MO), siendo

PB el sitio de menor valor y PC el de mayor valor ( $PB_{\%MO} < PMdP_{\%MO} < PC_{\%MO}$ ) en todas las temporadas, salvo en la temporada de verano donde fue mayor en PMdP ( $PB_{\%MO} < PC_{\%MO} < PMdP_{\%MO}$ ) (Tabla I.2).

**Tabla I.2.** Porcentaje de materia orgánica (%MO) en los sedimentos de los sitios de estudio a lo largo de las temporadas.

| TEMPORADA | Otoño |      |      | Invierno |      |      | Primavera |      |      | Verano |      |      |
|-----------|-------|------|------|----------|------|------|-----------|------|------|--------|------|------|
| SITIO     | PB    | PC   | PMdP | PB       | PC   | PMdP | PB        | PC   | PMdP | PB     | PC   | PMdP |
| % MO      | 0,89  | 1,29 | 1,12 | 0,75     | 1,37 | n.a  | 0,58      | 1,08 | n.a  | 0,39   | 0,56 | 0,79 |

n.a: no analizado. PB: Playa Brusquitas; PC: Planta Camet; PMdP: Puerto Mar del Plata.

### Hidrocarburos alifáticos en sedimento

Los resultados del análisis de hidrocarburos alifáticos en sedimento se resumen en la Tabla I.3. El intervalo de valores para el total de HAs ( $\sum HAs$ ) fue de 107,7 ng/g ps a 889,4 ng/g ps. Para todas las temporadas, los menores valores de  $\sum HAs$  se observaron en PB, mientras que los mayores fueron observados en PMdP (salvo en invierno y primavera donde no se contó con muestra suficiente para realizar el análisis y el valor más alto correspondió a PC). En PB el valor mínimo de  $\sum HAs$  se encontró en otoño y el máximo en invierno, mientras que en PC el valor mínimo se observó en verano y el máximo en otoño. En PMdP, no se pudo hacer el análisis para las temporadas de invierno y primavera debido a la poca cantidad de muestra disponible, aun así, el valor mínimo de  $\sum HAs$  se observó en verano mientras que el máximo correspondió al otoño; este sitio y temporada fue donde se encontraron los valores más altos para  $\sum HAs$  del total de las muestras analizadas. No se observaron mezclas de compuestos alifáticos no resueltas (MNR).

**Tabla I.3.** Concentraciones (ng/g peso seco) de hidrocarburos alifáticos en muestras de sedimento de los sitios de estudio lo largo de las distintas temporadas del año.

| TEMPORADA | Otoño   |       |       | Invierno |       |      | Primavera |       |      | Verano |       |       |
|-----------|---------|-------|-------|----------|-------|------|-----------|-------|------|--------|-------|-------|
| SITIO     | PB      | PC    | PMdP  | PB       | PC    | PMdP | PB        | PC    | PMdP | PB     | PC    | PMdP  |
| % Humedad | 2,7     | 16,9  | 13,9  | 2,6      | 7,5   | n.a  | 3,6       | 14    | n.a  | 20,9   | 10,7  | 17    |
| n-ALCANOS | ng/g ps |       |       |          |       |      |           |       |      |        |       |       |
| C10       | 0,0     | 33,9  | 1,6   | 0,6      | 0,6   | n.a  | 0,1       | 2,1   | n.a  | 15,9   | 13,9  | 1,1   |
| C11       | 3,0     | 0,2   | 20,6  | 3,4      | 2,2   | n.a  | 3,1       | 1,0   | n.a  | 4,8    | 3,1   | 9,3   |
| C12       | < LD    | < LD  | 11,6  | 1,3      | 5,7   | n.a  | 1,6       | 11,5  | n.a  | 2,8    | 2,3   | 7,6   |
| C13       | 1,1     | 0,6   | 1,8   | 1,0      | 2,3   | n.a  | 0,7       | 2,3   | n.a  | 0,7    | 0,8   | 1,4   |
| C14       | 2,6     | 7,1   | 15,7  | 3,1      | 10,0  | n.a  | 3,0       | 17,1  | n.a  | 3,6    | 4,0   | 17,7  |
| C15       | 3,2     | 10,2  | 35,0  | 3,7      | 6,9   | n.a  | 3,0       | 10,5  | n.a  | 5,4    | 3,6   | 28,4  |
| C16       | 6,1     | 18,1  | 2,3   | 7,9      | 1,7   | n.a  | 7,0       | 2,3   | n.a  | 10,6   | 9,4   | 26,1  |
| C17       | 9,8     | 20,6  | 118,6 | 12,1     | 1,1   | n.a  | 6,6       | 2,0   | n.a  | 0,7    | 13,1  | 65,3  |
| PRISTANO  | 7,6     | 15,6  | 58,0  | 4,1      | 2,3   | n.a  | 0,8       | 12,8  | n.a  | 12,3   | 9,0   | 29,6  |
| C18       | 13,7    | 49,9  | 219,3 | 9,1      | 33,7  | n.a  | 8,6       | 48,4  | n.a  | 16,4   | 20,7  | 99,6  |
| FITANO    | 24,9    | 84,7  | 225,1 | 21,9     | 38,6  | n.a  | 7,5       | 33,2  | n.a  | 67,9   | 33,6  | 134,3 |
| C19       | 6,8     | 13,6  | 73,6  | 8,9      | 11,6  | n.a  | 7,8       | 12,7  | n.a  | 10,7   | 11,0  | 45,8  |
| C20       | 9,8     | 35,2  | 25,6  | 4,8      | 16,3  | n.a  | 8,2       | 20,0  | n.a  | 12,6   | 13,4  | 8,4   |
| C21       | 1,7     | 4,0   | 39,9  | 3,9      | 2,2   | n.a  | 1,7       | 10,3  | n.a  | 3,6    | 4,6   | 17,6  |
| C22       | 15,3    | 38,6  | 158,0 | 9,3      | 21,3  | n.a  | 12,9      | 39,7  | n.a  | 7,8    | 20,3  | 90,1  |
| C23       | 4,8     | 71,1  | 39,6  | 2,5      | 14,3  | n.a  | 12,7      | 18,5  | n.a  | 5,6    | 21,0  | 68,6  |
| C24       | n.a     | n.a   | n.a   | n.a      | n.a   | n.a  | n.a       | n.a   | n.a  | n.a    | n.a   | n.a   |
| C25       | n.a     | n.a   | n.a   | n.a      | n.a   | n.a  | n.a       | n.a   | n.a  | n.a    | n.a   | n.a   |
| C26       | 4,71    | 5,42  | 1,21  | 10,22    | 8,57  | n.a  | 4,93      | 17,94 | n.a  | 0,00   | 4,62  | 18,86 |
| C27       | 5,07    | 8,84  | 59,66 | 8,37     | 22,06 | n.a  | 6,02      | 19,03 | n.a  | 14,32  | 7,38  | 19,75 |
| C28       | 4,81    | 15,01 | < LD  | 5,73     | 27,79 | n.a  | 4,79      | 18,19 | n.a  | 14,48  | 13,08 | 12,99 |
| C29       | 2,55    | 36,23 | < LD  | 103,23   | 23,57 | n.a  | 6,31      | 19,21 | n.a  | 14,73  | 12,46 | 13,06 |
| C30       | 3,70    | 70,30 | < LD  | 10,81    | 71,20 | n.a  | 8,41      | 14,77 | n.a  | 11,30  | 63,81 | 17,05 |
| C31       | 5,42    | 2,99  | 52,01 | 3,96     | 4,09  | n.a  | 5,91      | 23,03 | n.a  | 13,51  | 3,09  | 18,75 |
| C32       | 0,11    | 2,43  | 7,62  | 4,07     | 1,00  | n.a  | 0,30      | 19,59 | n.a  | 10,33  | 1,91  | 11,66 |
| C33       | 1,38    | 3,14  | 2,12  | 1,76     | 3,27  | n.a  | 2,12      | 7,60  | n.a  | 6,53   | 1,86  | 1,39  |
| C34       | 1,95    | 3,93  | 0,03  | 0,95     | 3,34  | n.a  | 1,83      | 9,06  | n.a  | 7,50   | 1,28  | 0,06  |
| C35       | 0,01    | 1,39  | 0,43  | 0,02     | 1,37  | n.a  | 0,01      | 2,89  | n.a  | 11,87  | 1,77  | 0,26  |
| C36       | 0,02    | 3,75  | 2,92  | 1,96     | 0,00  | n.a  | 0,01      | 0,03  | n.a  | 0,76   | 2,35  | 0,03  |
| C37       | 0,09    | 0,06  | 0,05  | 0,02     | < LD  | n.a  | 0,02      | 2,40  | n.a  | 1,57   | 0,01  | 0,04  |
| C38       | < LD    | < LD  | 0,06  | 0,19     | 0,04  | n.a  | < LD      | 0,09  | n.a  | 1,10   | 0,01  | 0,03  |
| C39       | 0,016   | < LD  | < LD  | < LD     | < LD  | n.a  | < LD      | 0,033 | n.a  | 0,025  | 0,031 | < LD  |
| C40       | 0,012   | < LD  | < LD  | < LD     | < LD  | n.a  | 0,019     | 0,039 | n.a  | < LD   | < LD  | < LD  |
| ΣHAs      | 107,7   | 456,7 | 889,4 | 222,9    | 296,3 | n.a  | 117,7     | 352,1 | n.a  | 209,4  | 254,9 | 600,9 |

n.a: no analizado; ΣHAs: hidrocarburos alifáticos totales; LD: límite de detección; PB: Playa Brusquitas; PC: Planta Camet; PMdP: Puerto Mar del Plata.

## **Hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimento**

Los resultados del análisis de hidrocarburos aromáticos en sedimento se resumen en la Tabla I.4. Teniendo en cuenta todos los sitios y temporadas, los valores de  $\Sigma$ HAPs se encontraron entre 125 ng/g ps y 1316 ng/g ps. En PB, los valores mínimos de  $\Sigma$ HAPs se observaron en invierno y los máximos en primavera, mientras que en PC el mínimo se observó en primavera y el máximo en otoño, este último, fue el valor máximo y de un orden superior a lo observado en los demás sitios y temporadas. En PMdP, el valor mínimo de  $\Sigma$ HAPs se encontró en verano mientras que el máximo correspondió a la temporada de otoño. Además, en todos los sitios se encontraron distintas concentraciones de una mezcla de compuestos no resuelta en todas las temporadas. En los sedimentos de PB, el intervalo de valores de esta mezcla varió entre 167 y 12409 ng/g ps. En PC, la mezcla no resuelta varió entre 657 y 112689 ng/g ps, y este valor fue el más alto de todos los sitios y temporadas. En PMdP, el valor mínimo de mezcla no resuelta fue de 1277 ng/g ps y el máximo de 85390 ng/g ps.

**Tabla I.4.** Concentraciones (ng/g peso seco) de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en sedimento de los sitios de estudio lo largo de las distintas temporadas del año. Se distinguen en negrita los nombres de los 16 HAPs prioritarios.

| TEMPORADA                   | Otoño       |               |              | Invierno     |               |            | Primavera  |            |            | Verano      |              |             |
|-----------------------------|-------------|---------------|--------------|--------------|---------------|------------|------------|------------|------------|-------------|--------------|-------------|
| SITIO                       | PB          | PC            | PMdP         | PB           | PC            | PMdP       | PB         | PC         | PMdP       | PB          | PC           | PMdP        |
| % Humedad                   | 71          | 78            | 82           | 81           | 82            | 84         | 73         | 80         | 72         | 74          | 82           | 67          |
| HAPs                        | ng/g ps     |               |              |              |               |            |            |            |            |             |              |             |
| <b>Naftaleno</b>            | 8           | < LD          | < LD         | < LD         | < LD          | n.a        | < LD       | < LD       | n.a        | < LD        | 1            | 3           |
| 1Metil Naftaleno            | < LD        |               | 1            | 2            | < LD          | n.a        | 3          | 3          | n.a        | < LD        | 3            | < LD        |
| 2Metil Naftaleno            | 3           |               | 2            | < LD         | 5             | n.a        | 2          | 3          | n.a        | < LD        | 1            | < LD        |
| Bifenil                     | 11          | 13            | 7            | 5            | 15            | n.a        | 12         | 14         | n.a        | 15          | 9            | 22          |
| 26DiMetil Naftaleno         | < LD        | < LD          | < LD         | < LD         | < LD          | n.a        | < LD       | < LD       | n.a        | < LD        | < LD         | < LD        |
| <b>Acenaftileno</b>         | < LD        | < LD          | < LD         | < LD         | < LD          | n.a        | < LD       | < LD       | n.a        | 2           | < LD         | < LD        |
| <b>Acenafteno</b>           | 2           | 3             | 3            | 1            | < LD          | n.a        | 1          | < LD       | n.a        | 2           | 1            | < LD        |
| 235 TriMetil Naftaleno      | 7           | 10            | < LD         | 4            | 5             | n.a        | 8          | 9          | n.a        | 8           | 7            | 14          |
| <b>Fluoreno</b>             | < LD        | < LD          | 2            | < LD         | 3             | n.a        | < LD       | 3          | n.a        | < LD        | 1            | < LD        |
| <b>Fenantreno</b>           | 9           | 19            | 12           | 7            | 12            | n.a        | 6          | 12         | n.a        | 12          | 7            | 17          |
| <b>Antraceno</b>            | 7           | 9             | 8            | 4            | 6             | n.a        | 5          | 8          | n.a        | < LD        | 7            | 9           |
| MeFenantreno                | 41          | 64            | 2            | 4            | 24            | n.a        | 43         | 2          | n.a        | 24          | 36           | 22          |
| <b>Fluoranteno</b>          | 3           | 3             | < LD         | 1            | < LD          | n.a        | < LD       | 9          | n.a        | 6           | 3            | 15          |
| <b>Pireno</b>               | < LD        | < LD          | < LD         | 7            | < LD          | n.a        | < LD       | < LD       | n.a        | < LD        | < LD         | < LD        |
| <b>Benzo(a)antraceno</b>    | < LD        | < LD          | < LD         | 17           | 11            | n.a        | < LD       | 8          | n.a        | < LD        | 4            | < LD        |
| <b>Criseno</b>              | 6           | 15            | < LD         | 2            | < LD          | n.a        | < LD       | 8          | n.a        | < LD        | 5            | < LD        |
| <b>Benzo(b)fluoranteno</b>  | 121         | 171           | < LD         | 6            | 123           | n.a        | 19         | 13         | n.a        | 56          | < LD         | 11          |
| <b>Benzo(k)fluoranteno</b>  | < LD        | < LD          | 78           | < LD         | < LD          | n.a        | 198        | 5          | n.a        | 27          | 22           | < LD        |
| Benzo(e)pireno              | < LD        | 62            | < LD         | < LD         | < LD          | n.a        | < LD       | < LD       | n.a        | < LD        | 43           | < LD        |
| <b>Benzo(a)pireno</b>       | < LD        | 403           | 77           | 66           | 354           | n.a        | < LD       | 4          | n.a        | < LD        | 270          | < LD        |
| Perileno                    | 21          | 506           | < LD         | < LD         | < LD          | n.a        | 6          | 25         | n.a        | 73          | 123          | 8           |
| <b>Indeno(123)pireno</b>    | < LD        | < LD          | < LD         | < LD         | < LD          | n.a        | < LD       | < LD       | n.a        | < LD        | < LD         | < LD        |
| <b>Dibenzo(ah)antraceno</b> | 51          | 41            | < LD         | < LD         | 51            | n.a        | < LD       | 11         | n.a        | 45          | 28           | 21          |
| <b>Benzo(ghi)perileno</b>   | < LD        | < LD          | 78           | < LD         | < LD          | n.a        | < LD       | < LD       | n.a        | < LD        | < LD         | < LD        |
| <b>ΣHAPs prioritarios</b>   | <b>208</b>  | <b>661</b>    | <b>201</b>   | <b>111</b>   | <b>565</b>    | <b>n.a</b> | <b>232</b> | <b>83</b>  | <b>n.a</b> | <b>151</b>  | <b>352</b>   | <b>77</b>   |
| <b>ΣHAPs</b>                | <b>288</b>  | <b>1316</b>   | <b>211</b>   | <b>125</b>   | <b>608</b>    | <b>n.a</b> | <b>304</b> | <b>136</b> | <b>n.a</b> | <b>271</b>  | <b>572</b>   | <b>142</b>  |
| <b>MNR</b>                  | <b>895</b>  | <b>112689</b> | <b>85390</b> | <b>12409</b> | <b>75793</b>  | <b>n.a</b> | <b>167</b> | <b>657</b> | <b>n.a</b> | <b>1438</b> | <b>66931</b> | <b>1277</b> |
| <b>ΣHAPs + MNR</b>          | <b>1183</b> | <b>114004</b> | <b>85601</b> | <b>12535</b> | <b>114004</b> | <b>n.a</b> | <b>472</b> | <b>793</b> | <b>n.a</b> | <b>1709</b> | <b>67504</b> | <b>1419</b> |

n.a: no analizado; ΣHAPs: total hidrocarburos aromáticos policíclicos; MNR: mezcla de compuestos aromáticos no resuelta; LD: límite de detección; PB: Playa Brusquitas; PC: Planta Camet; PMdP: Puerto Mar del Plata.

## Metales en sedimento

Los resultados de los 4 metales analizados (Cd, Ni, Pb y Zn) en los distintos sitios de estudio y temporadas se detallan en la Tabla I.5. No se detectó presencia de Cd en ningún sitio y temporada mientras que en la temporada de invierno no se registró la presencia de

ninguno de los metales analizados. El Zn (0,76-8,42 µg/g ps) fue metal más abundante y estuvo presente en todos los sitios y temporadas, su concentración fue siempre menor en PB que en PC y PMdP, salvo en verano, cuando fue mayor en PB que en PC. El Ni (0,79-1,16 µg/g ps) solo fue detectado en PC durante el otoño y en PMdP durante el otoño y el verano. El Pb presentó un intervalo de valores de 0,86 µg/g ps a 1,73 µg/g ps y solo fue registrado en PC y PMdP durante el otoño y verano y en PC durante la primavera. En invierno no se registró la presencia de ninguno de los metales analizados.

**Tabla I.5.** Determinación de metales traza (µg/g peso seco) en sedimento de los distintos sitios de estudio y temporadas. Se indica entre paréntesis el valor del LD (límite de detección) para cada metal.

| TEMPORADA | SITIO | Metal traza (µg/g ps) en sedimento |              |              |              |
|-----------|-------|------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|           |       | Cd<br>(0,25)                       | Ni<br>(0,65) | Pb<br>(0,70) | Zn<br>(0,70) |
| Otoño     | PB    | < LD                               | < LD         | < LD         | 2,10         |
|           | PC    | < LD                               | 0,79         | 1,73         | 6,54         |
|           | PMdP  | < LD                               | 1,16         | 1,44         | 8,42         |
| Invierno  | PB    | < LD                               | < LD         | < LD         | < LD         |
|           | PC    | < LD                               | < LD         | < LD         | < LD         |
|           | PMdP  | n.a                                | n.a          | n.a          | n.a          |
| Primavera | PB    | < LD                               | < LD         | < LD         | 0,76         |
|           | PC    | < LD                               | < LD         | 0,86         | 5,52         |
|           | PMdP  | n.a                                | n.a          | n.a          | n.a          |
| Verano    | PB    | < LD                               | < LD         | < LD         | 6,63         |
|           | PC    | < LD                               | < LD         | 0,74         | 4,52         |
|           | PMdP  | < LD                               | 1,15         | 1,10         | 8,10         |

n.a: no analizado; LD: límite de detección; PB: Playa Brusquitas; PC: Planta Camet; PMdP: Puerto Mar del Plata.

La significancia toxicológica de cada contaminante se representa en la Tabla I.6, en donde se expresan los valores Guía de la Calidad de los Sedimentos y el cálculo del cociente SQG-Q para la mediana de los HAPs prioritarios individuales,  $\Sigma$ HAPs prioritarios y metales para cada sitio. En todos los sitios los HAPs prioritarios individuales se encontraron dentro del límite establecido para sedimentos no impactados ( $\text{SQG-Q} < 0,1$ ), excepto en PC donde las concentraciones de benzo(a)pireno y dibenceno(ah)antraceno presentan valores de SQG-Q de 0,20 y 0,13 respectivamente. La mediana de los  $\Sigma$ HAPs prioritarios y los metales en todos los sitios se encuentra por debajo del ERL.

**Tabla I.6.** Mediana (ng/g ps para HAPs y  $\mu\text{g/g}$  ps para metales) y significancia toxicológica de los contaminantes en cada sitio, expresada mediante los Cocientes Guía de Calidad de Sedimentos (SQG-Qs) usando los valores guía establecidos por Long y colaboradores (1995).

| CONTAMINANTE               | ERL  | ERM   | PB      |        | PC      |        | PMdP    |        |
|----------------------------|------|-------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
|                            |      |       | Mediana | SQG-Q  | Mediana | SQG-Q  | Mediana | SQG-Q  |
| Naftaleno                  | 160  | 2100  | -       | -      | -       | -      | 0,95    | < 0,01 |
| Acenaftileno               | 44   | 640   | 0,89    | 0,01   | -       | -      | -       | -      |
| Acenafteno                 | 16   | 500   | 1,39    | < 0,01 | 0,57    | < 0,01 | 1,66    | < 0,01 |
| Fluoreno                   | 19   | 540   | -       | -      | 1,87    | < 0,01 | 0,82    | < 0,01 |
| Fenantreno                 | 240  | 1500  | 8,91    | 0,01   | 11,98   | 0,01   | 11,76   | 0,01   |
| Antraceno                  | 85,3 | 1100  | 1,96    | < 0,01 | 7,50    | 0,01   | 7,98    | 0,01   |
| Fluoranteno                | 600  | 5100  | 3,71    | < 0,01 | 2,89    | < 0,01 | 9,40    | < 0,01 |
| Pireno                     | 665  | 2600  | -       | -      | -       | -      | -       | -      |
| Benzo(a)antraceno          | 261  | 1600  | -       | -      | 6,16    | < 0,01 | 4,51    | < 0,01 |
| Criseno                    | 384  | 2800  | 0,95    | < 0,01 | 6,85    | < 0,01 | 6,10    | < 0,01 |
| Benzo(b)fluoranteno        | -    | -     | 32,04   | -      | 68,02   | -      | 29,28   | -      |
| Benzo(k)fluoranteno        | -    | -     | 13,56   | -      | 2,26    | -      | 1,15    | -      |
| Benzo(a)pireno             | 430  | 1600  | -       | -      | 311,88  | 0,20   | 68,65   | 0,04   |
| Indeno(123)pireno          | -    | -     | -       | -      | -       | -      | -       | -      |
| Dibenzo(ah)antraceno       | 63,4 | 260   | 22,69   | 0,1    | 34,27   | 0,13   | 10,31   | 0,04   |
| Benzo(ghi)perileno         | -    | -     | -       | -      | -       | -      | -       | -      |
| $\Sigma$ HAPs prioritarios | 4022 | 44792 | 178,05  | < 0,01 | 455,37  | 0,01   | 162,21  | < 0,01 |
| Ni                         | 20,9 | 51,6  | -       | -      | 0,79    | 0,01   | 1,15    | 0,02   |
| Pb                         | 46,7 | 218   | -       | -      | 0,86    | < 0,01 | 1,27    | < 0,01 |
| Zn                         | 150  | 410   | 2,10    | < 0,01 | 5,52    | 0,01   | 8,26    | 0,02   |

ERL: Efecto de Rango Bajo; ERM: Efecto de Rango Medio; PB: Playa Brusquitas; PC: Planta Camet; PMdP: Puerto Mar del Plata.

### 1.2.3 Compuestos orgánicos y metales traza en mejillín

#### Hidrocarburos alifáticos en mejillines

Los resultados del análisis de HAs en *B. rodriguezii* se resumen en la Tabla I.7. Teniendo en cuenta todos los sitios y temporadas, los valores de  $\Sigma$ HAs se encontraron entre 6583 ng/g ps y 260396 ng/g ps. En PB, los valores mínimos de  $\Sigma$ HAs se observaron en primavera y los máximos en otoño, mientras que en PC el mínimo se observó en otoño y el máximo en invierno. En PMdP, el valor mínimo de  $\Sigma$ HAs se encontró en verano mientras que el máximo correspondió a la temporada de primavera, siendo este último el valor máximo y de un orden superior a lo observado en los demás sitios y temporadas. Además, en este sitio se encontraron altas concentraciones de una mezcla de compuestos no resuelta en todas las temporadas (25152-1132143 ng/g ps).

**Tabla I.7.** Concentraciones (ng/g peso seco) de hidrocarburos alifáticos en *Brachidontes rodriguezii* de los sitios de estudio lo largo de las distintas temporadas del año.

| TEMPORADA  | Otoño   |       |        | Invierno |       |        | Primavera |       |         | Verano |       |       |
|------------|---------|-------|--------|----------|-------|--------|-----------|-------|---------|--------|-------|-------|
| SITIO      | PB      | PC    | PMdP   | PB       | PC    | PMdP   | PB        | PC    | PMdP    | PB     | PC    | PMdP  |
| % Humedad  | 71      | 78    | 82     | 81       | 82    | 84     | 73        | 80    | 72      | 74     | 82    | 67    |
| n-ALCANOS  | ng/g ps |       |        |          |       |        |           |       |         |        |       |       |
| C10        | 19      | 2     | < LD   | 402      | < LD  | 129    | 248       | 253   | 54      | 2      | 318   | 6     |
| C11        | 34      | 13    | < LD   | 84       | 79    | 233    | 80        | 177   | 244     | 58     | 113   | 32    |
| C12        | < LD    | < LD  | < LD   | < LD     | < LD  | 1889   | < LD      | < LD  | 1740    | < LD   | 1     | < LD  |
| C13        | 18      | 34    | 658    | 5        | 21    | 1723   | 64        | 166   | 6257    | 59     | 184   | 60    |
| C14        | < LD    | < LD  | 3920   | < LD     | < LD  | 8472   | < LD      | < LD  | 20348   | < LD   | < LD  | < LD  |
| C15        | 17      | 311   | 3844   | 158      | 786   | 11003  | 587       | 880   | 31034   | 341    | 710   | 298   |
| C16        | < LD    | < LD  | 4477   | < LD     | < LD  | 13047  | < LD      | < LD  | 29072   | < LD   | < LD  | 0     |
| C17        | 42      | 552   | 4969   | 748      | 1355  | 13200  | 563       | 763   | 28636   | 134    | 1127  | 326   |
| PRISTANO   | 233     | 599   | 25795  | 155      | 757   | 10942  | 410       | 561   | 22800   | 131    | 588   | 874   |
| C18        | 992     | 720   | 3129   | 1691     | 1613  | 12628  | 908       | 317   | 26254   | 801    | 1007  | 439   |
| FITANO     | 86      | 179   | 19829  | 89       | 498   | 8820   | 88        | 512   | 16189   | 374    | 1461  | 722   |
| C19        | 723     | 358   | 2762   | 1776     | 1142  | 11291  | 536       | 501   | 29693   | 436    | 331   | 295   |
| C20        | 461     | 451   | 5700   | 332      | 921   | 11815  | 42        | 199   | 22665   | 121    | 339   | 307   |
| C21        | 381     | 280   | 4858   | 512      | 833   | 9741   | 218       | 668   | 17661   | 193    | 409   | 296   |
| C22        | 5571    | 7028  | 5      | 18       | 7975  | 14725  | 4893      | 3068  | 18807   | 6192   | 7409  | 2594  |
| C23        | 3360    | 372   | 10767  | 2425     | 670   | 11     | 933       | 3432  | 13122   | 277    | 922   | 12    |
| C24        | 1104    | 811   | 11706  | 290      | 1260  | 7059   | 407       | 314   | 39      | 991    | 705   | 620   |
| C25        | 775     | 756   | 193    | 778      | 1060  | 4569   | 91        | 279   | 5877    | 913    | 841   | 428   |
| C26        | 877     | 24    | 4      | 413      | 1086  | 718    | 470       | 472   | 3267    | 5      | 903   | 205   |
| C27        | 806     | 731   | 3020   | 1245     | 933   | 1917   | 742       | 938   | 2148    | 934    | 1552  | 307   |
| C28        | 736     | 582   | 1791   | 866      | 762   | 1155   | 374       | 207   | 1020    | 667    | 364   | 222   |
| C29        | 486     | 570   | 144    | 307      | 649   | 828    | 425       | 426   | 625     | 516    | 581   | 36    |
| C30        | 414     | 1     | 1151   | 171      | 598   | 820    | 240       | 419   | 493     | 23     | 412   | 265   |
| C31        | 435     | 3     | 2      | 438      | 602   | 2      | 375       | 505   | 574     | 548    | 681   | 238   |
| C32        | 63      | 195   | 445    | 175      | 5     | 335    | 123       | 165   | 313     | 258    | 262   | 140   |
| C33        | 155     | 1     | 20     | 193      | 245   | 763    | 101       | 205   | 286     | 166    | 266   | 9     |
| C34        | 4       | 101   | 366    | 66       | 94    | 347    | 21        | 42    | 201     | 52     | 114   | 1     |
| C35        | < LD    | < LD  | 148    | 154      | < LD  | 103    | 2         | 29    | < LD    | < LD   | 37    | 64    |
| C36        | 345     | < LD  | 2      | 33       | 1     | < LD   | 3         | 7     | 1       | 1      | 2     | 1     |
| C37        | 2       | 10    | < LD   | 2        | 6     | < LD   | 2         | 1     | 1       | 4      | 2     | < LD  |
| C38        | < LD    | < LD  | < LD   | < LD     | < LD  | < LD   | 1         | 3     | < LD    | 2      | 2     | < LD  |
| C39        | 1       | 3     | 2      | 2        | 3     | 2      | 2         | 2     | 2       | < LD   | < LD  | 2     |
| C40        | 2       | < LD  | < LD   | 4        | < LD  | < LD   | < LD      | 2     | < LD    | < LD   | 3     | 1     |
| Σn-alcános | 16718   | 13098 | 52377  | 12997    | 21440 | 121466 | 12043     | 14127 | 260396  | 12706  | 18893 | 6583  |
| MNR        | n.d     | n.d   | 783333 | n.d      | n.d   | 390625 | n.d       | n.d   | 1132143 | n.d    | n.d   | 25152 |
| ΣHAs       | 16718   | 13098 | 835710 | 12997    | 21440 | 512091 | 12043     | 14127 | 1392539 | 12706  | 18893 | 31735 |

n.d: no detectado; MNR: mezcla de compuestos alifáticos no resuelta; ΣHAs: hidrocarburos alifáticos totales; LD: límite de detección; PB: Playa Brusquitas; PC: Planta Camet; PMdP: Puerto Mar del Plata.

## **Hidrocarburos aromáticos policíclicos en mejillines**

Los resultados del análisis de HAPs individuales y totales ( $\Sigma$ HAPs) en *B. rodriguezii* se resumen en la Tabla I.8. El intervalo de valores de  $\Sigma$ HAPs observado fue de 2639 ng/g ps a 38585 ng/g ps. En PB, se detectaron todos los HAPs prioritarios menos el benzo(a)pireno y el indeno(123)pireno. El valor mínimo de  $\Sigma$ HAPs se encontró en otoño y el máximo en invierno. En PC, no se encontró benzo(a)pireno, dibenceno(ah)antraceno y el benzo(ghi)perileno en ninguna temporada y el valor mínimo de  $\Sigma$ HAPs se observó en primavera mientras que el valor máximo en invierno. En PMdP, se detectaron todos los HAPs prioritarios y el valor mínimo de  $\Sigma$ HAPs se encontró en invierno y el máximo en otoño, y este último fue el valor más alto observado en todos los sitios y temporadas. Además, en este sitio se encontraron altas concentraciones de una mezcla de compuestos no resuelta (30007-500915 ng/g ps). Teniendo en cuenta esta mezcla, la concentración de todos los hidrocarburos encontrados en los distintos sitios varió entre 2639 y 539499 ng/g ps. En el caso de los  $\Sigma$ HAPs prioritarios se observó el mismo patrón espacio-temporal que para los  $\Sigma$ HAPs.

**Tabla I.8.** Concentraciones (ng/g peso seco) de hidrocarburos aromáticos policíclicos en *Brachidontes rodriguezii* de los sitios de estudio lo largo de las distintas temporadas del año. Se distinguen en negrita los nombres de los 16 HAPs prioritarios.

| TEMPORADA                   | Otoño       |             |               | Invierno    |              |               | Primavera   |             |               | Verano      |              |              |
|-----------------------------|-------------|-------------|---------------|-------------|--------------|---------------|-------------|-------------|---------------|-------------|--------------|--------------|
| SITIO                       | PB          | PC          | PMdP          | PB          | PC           | PMdP          | PB          | PC          | PMdP          | PB          | PC           | PMdP         |
| % Humedad                   | 71          | 78          | 82            | 81          | 82           | 84            | 73          | 80          | 72            | 74          | 82           | 67           |
| HAPs                        | ng/g ps     |             |               |             |              |               |             |             |               |             |              |              |
| <b>Naftaleno</b>            | 143         | 328         | 229           | < LD        | 649          | 944           | 1616        | 936         | 5             | 303         | 206          | 71           |
| 1Metil Naftaleno            | 4           | < LD        | < LD          | 112         | 112          | 38            | 77          | 113         | 252           | < LD        | < LD         | 4            |
| 2Metil Naftaleno            | 49          | < LD        | 85            | < LD        | 40           | 205           | 142         | < LD        | 247           | 4           | < LD         | < LD         |
| Bifenil                     | < LD        | 62          | < LD          | < LD        | 10           | 7             | 40          | 67          | 13            | 22          | < LD         | < LD         |
| 26DiMetil Naftaleno         | 213         | 585         | 373           | 65          | 336          | 510           | 204         | 290         | 2080          | 202         | 206          | 139          |
| <b>Acenaftileno</b>         | < LD        | 33          | 71            | < LD        | < LD         | 65            | < LD        | < LD        | 835           | 5           | < LD         | < LD         |
| <b>Acenafteno</b>           | 82          | < LD        | 204           | 282         | < LD         | 123           | < LD        | < LD        | 357           | 12          | 14           | 16           |
| 235 TriMetil Naftaleno      | < LD        | < LD        | 363           | < LD        | 141          | < LD          | 14          | 23          | 2920          | 111         | 134          | 55           |
| <b>Fuoreno</b>              | 6           | 9           | 413           | < LD        | 42           | 296           | 69          | < LD        | 738           | < LD        | < LD         | < LD         |
| <b>Fenantreno</b>           | 21          | 168         | 583           | 899         | 406          | 230           | < LD        | < LD        | 2353          | 402         | 1031         | < LD         |
| <b>Antraceno</b>            | 973         | 4608        | 3351          | 392         | 4820         | 665           | 36          | 685         | 562           | 298         | 5369         | 1474         |
| MeFenantreno                | 568         | 288         | 3174          | < LD        | 461          | 1827          | < LD        | < LD        | 2313          | 1224        | 615          | 22           |
| <b>Fluoranteno</b>          | 35          | < LD        | 5694          | 1185        | 157          | 1962          | 280         | 1457        | 3784          | 1067        | 181          | 178          |
| <b>Pireno</b>               | < LD        | 120         | 606           | 1145        | 48           | 376           | < LD        | < LD        | 688           | 139         | < LD         | 25           |
| <b>Benzo(a)antraceno</b>    | 64          | 314         | 713           | 154         | 89           | 172           | < LD        | 115         | 27            | 152         | 1046         | 307          |
| <b>Criseno</b>              | 3           | < LD        | 737           | 224         | 72           | 847           | 60          | 132         | 1031          | 20          | < LD         | 31           |
| <b>Benzo(b)flouranteno</b>  | 64          | 333         | 198           | < LD        | 723          | 147           | 12          | 113         | < LD          | 16          | 489          | 26           |
| <b>Benzo(k)fluoranteno</b>  | 25          | < LD        | 138           | < LD        | < LD         | 46            | < LD        | < LD        | 20            | 65          | 21           | 22           |
| Benzo(e)pireno              | 282         | < LD        | 321           | 659         | < LD         | 432           | 343         | < LD        | 487           | 421         | 256          | < LD         |
| <b>Benzo(a)pireno</b>       | < LD        | < LD        | 20373         | < LD        | < LD         | < LD          | < LD        | < LD        | < LD          | < LD        | < LD         | 1737         |
| Perileno                    | < LD        | 259         | < LD          | 99          | < LD         | 241           | 29          | 450         | 13            | < LD        | 730          | 530          |
| <b>Indeno(123)pireno</b>    | < LD        | < LD        | < LD          | < LD        | 1908         | < LD          | < LD        | < LD        | < LD          | < LD        | 0            | 923          |
| <b>Dibenzo(ah)antraceno</b> | < LD        | < LD        | 959           | 764         | < LD         | < LD          | < LD        | < LD        | < LD          | < LD        | < LD         | 3646         |
| <b>Benzo(ghi)perileno</b>   | 107         | < LD        | < LD          | < LD        | < LD         | 11            | < LD        | < LD        | < LD          | 34          | < LD         | < LD         |
| <b>ΣHAPs prioritarios</b>   | <b>1572</b> | <b>5913</b> | <b>34354</b>  | <b>5043</b> | <b>8955</b>  | <b>6089</b>   | <b>2215</b> | <b>3437</b> | <b>10646</b>  | <b>2515</b> | <b>8358</b>  | <b>8457</b>  |
| <b>ΣHAPs</b>                | <b>2639</b> | <b>7107</b> | <b>38585</b>  | <b>5978</b> | <b>10015</b> | <b>9145</b>   | <b>2923</b> | <b>4380</b> | <b>18722</b>  | <b>4496</b> | <b>10299</b> | <b>9207</b>  |
| <b>MNR</b>                  | <b>n.d.</b> | <b>n.d.</b> | <b>500915</b> | <b>n.d.</b> | <b>n.d.</b>  | <b>238465</b> | <b>n.d.</b> | <b>n.d.</b> | <b>122497</b> | <b>n.d.</b> | <b>n.d.</b>  | <b>30007</b> |
| <b>ΣHAPs + MNR</b>          | <b>2639</b> | <b>7107</b> | <b>539499</b> | <b>5978</b> | <b>10015</b> | <b>247610</b> | <b>2923</b> | <b>4380</b> | <b>141218</b> | <b>4496</b> | <b>10299</b> | <b>39214</b> |

n.d: no detectado; ΣHAPs: total hidrocarburos aromáticos policíclicos; MNR: mezcla de compuestos aromáticos no resuelta; LD: límite de detección; PB: Playa Brusquitas; PC: Planta Camet; PMdP: Puerto Mar del Plata.

## Metales en mejillín

Los resultados de los 5 metales (Cd, Cr, Ni, Pb y Zn) analizados en los distintos sitios de estudio y temporadas se detallan en la Tabla I.9. El Cd presentó valores entre 1,3 µg/g ps y 7,73 µg/g ps, encontrándose en PB en todas las temporadas. En los ejemplares de PC,

también se observó Cd en todas las temporadas excepto en primavera y en PMdP no fue detectado. El Cr (1,89-10,78 µg/g ps) fue observado en PB en todas las temporadas excepto invierno, mientras que en PC solo en invierno. El Ni presentó valores entre 1,18 µg/g ps y 2,65 µg/g ps, en PB solo fue detectado en invierno y en PC en todas las temporadas. Solo se encontró Ni en PMdP en verano. Las concentraciones de Pb en los ejemplares estudiados en todos los sitios y temporadas estuvieron por debajo del LD mientras que se detectó la presencia de Zn (65-122 µg/g ps) en todos los sitios y temporadas analizados.

**Tabla I.9.** Determinación de metales traza (µg/g peso seco) en masa visceral de *Brachidontes rodriguezii* en los distintos sitios de estudio y temporadas. Se indica entre paréntesis el valor del límite de detección de cada metal.

| TEMPORADA | SITIO | Metal traza (µg/g ps) en masa visceral |              |              |              |              |
|-----------|-------|----------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|           |       | Cd<br>(0,42)                           | Cr<br>(0,89) | Ni<br>(1,18) | Pb<br>(3,14) | Zn<br>(0,18) |
| Otoño     | PB    | 5,8                                    | < LD         | < LD         | < LD         | 109          |
|           | PC    | 2,3                                    | < LD         | 1,18         | < LD         | 68           |
|           | PMdP  | < LD                                   | < LD         | < LD         | < LD         | 69           |
| Invierno  | PB    | 7,3                                    | 2,62         | 2,65         | < LD         | 76           |
|           | PC    | 2,0                                    | 1,89         | 2,17         | < LD         | 65           |
|           | PMdP  | < LD                                   | < LD         | < LD         | < LD         | 122          |
| Primavera | PB    | 1,3                                    | 2,13         | < LD         | < LD         | 75           |
|           | PC    | < LD                                   | < LD         | 1,52         | < LD         | 73           |
|           | PMdP  | < LD                                   | < LD         | < LD         | < LD         | 104          |
| Verano    | PB    | 2,9                                    | 10,78        | < LD         | < LD         | 71           |
|           | PC    | 1,3                                    | < LD         | 2,27         | < LD         | 98           |
|           | PMdP  | < LD                                   | < LD         | 1,39         | < LD         | 91           |

LD: límite de detección; PB: Playa Brusquitas; PC: Planta Camet; PMdP: Puerto Mar del Plata.

## 1.2.4 Evaluación del origen de los compuestos orgánicos

### Evaluación del origen de los hidrocarburos alifáticos

Los índices de evaluación del posible origen de los HAs presentes en los sedimentos de los sitios de estudio a lo largo de las distintas temporadas se detallan en la Tabla I.10. El índice MH indicó principalmente la presencia de compuestos pesados excepto en PB durante el verano, en PC durante la primavera y en PMdP durante todas las temporadas analizadas.

El índice LMW/HMW presentó valores entre 0,49 y 1,72 para PB, entre 0,65 y 1,08 para PC y entre 1,64 y 2,2 para PMdP. El índice n-C16 fue siempre > 15 mientras que el CPI se encontró alrededor del 1, excepto para PMdP en otoño y en PB en invierno. El índice par/impar se encontró entre 0,43 y 1,9. En el caso del índice Pri/Phy, en todos los sitios y temporadas, fue mayor que 1. El n-C17/Pri fue mayor que 1 en todos los sitios y temporadas analizados, mientras que el índice n-C18/Phy se encontró en el intervalo 0,24 y 1,15 para PB, 0,59 y 1,46 para PC y entre 0,74 y 0,97 para PMdP.

**Tabla I.10.** Valores de los índices de evaluación de los hidrocarburos alifáticos de las muestras de sedimento de los sitios de estudio a lo largo de las distintas temporadas.

| TEMPORADA | SITIO | ÍNDICE |             |                   |       |               |             |               |               |
|-----------|-------|--------|-------------|-------------------|-------|---------------|-------------|---------------|---------------|
|           |       | MH     | LMW/<br>HMW | Relación<br>n-C16 | CPI   | Par/<br>impar | Pri/<br>Phy | n-C17/<br>Pri | n-C18/<br>Phy |
| Otoño     | PB    | C22    | 1,72        | 17,78             | 0,85  | 1,27          | 3,27        | 1,29          | 0,55          |
|           | PC    | C23    | 1,08        | 25,26             | 0,85  | 1,44          | 5,43        | 1,32          | 0,59          |
|           | PMdP  | C18    | 2,22        | 383,4             | 98,78 | 0,64          | 3,88        | 2,05          | 0,97          |
| Invierno  | PB    | C29    | 0,49        | 28,24             | 6,87  | 0,43          | 5,35        | 2,95          | 0,41          |
|           | PC    | C30    | 0,65        | 171,4             | 0,67  | 1,79          | 16,74       | 0,47          | 0,87          |
|           | PMdP  | n.a    | n.a         | n.a               | n.a   | n.a           | n.a         | n.a           | n.a           |
| Primavera | PB    | C22    | 0,85        | 16,87             | 1,08  | 0,96          | 9,38        | 8,25          | 1,15          |
|           | PC    | C18    | 0,79        | 150,1             | 1,11  | 1,41          | 2,59        | 0,15          | 1,46          |
|           | PMdP  | n.a    | n.a         | n.a               | n.a   | n.a           | n.a         | n.a           | n.a           |
| Verano    | PB    | C18    | 1,31        | 19,75             | 1,44  | 1,18          | 5,5         | 0,06          | 0,24          |
|           | PC    | C30    | 0,86        | 27,03             | 0,42  | 1,9           | 3,73        | 1,46          | 0,62          |
|           | PMdP  | C18    | 1,64        | 23                | 1,06  | 0,83          | 4,55        | 2,21          | 0,74          |

MH: Hidrocarburo principal; LMW/HMW: Hidrocarburos de bajo/alto peso molecular; Relación n-C16:  $\Sigma$ n-alcanos/n-C16; CPI: Índice de preferencia de carbono; Par/impar: Relación par/impar; Pri/Phy: Relación Pristano/Fitano; n-C17/Pri: n-C17/Pristano; n-C18/Phy: n-18/Fitano. PB: Playa Brusquitas; PC: Planta Camet; PMdP: Puerto Mar del Plata.

Los índices de evaluación del posible origen de los HAs presentes en *B. rodriguezii* de los sitios de estudio a lo largo de las distintas temporadas se detallan en la Tabla I.11. En la mayoría de los sitios y temporadas el hidrocarburo principal encontrado fue el C22. El índice LMW/HMW fue menor que 1 en todos los sitios y temporadas excepto para PMdP durante

otoño, invierno y primavera. La relación n-C16 solo se pudo calcular para PMdP, ya que no se encontró C16 en el resto de los sitios, y fue < 15. El CPI presentó valores entre 0,75 y 2,19, mientras que el índice par/impar se encontró en el intervalo de 0,51 a 2,48. En el caso del índice Pri/Phy, en todos los sitios y temporadas, fue mayor que 1, excepto en PB y PC durante el verano. Para el índice n-C17/Pri se observaron valores entre 0,19 y 1,92 excepto en PB durante el invierno, que fue mayor, mientras que el índice n-C18/Phy se encontró entre 2,14 y 19 para PB, entre 0,62 y 4,03 para PC y en el intervalo de 0,16 y 1,62 para PMdP.

**Tabla I.11.** Valores de los índices de evaluación de los hidrocarburos alifáticos en *Brachidontes rodriguezii* de los sitios de estudio a lo largo de las distintas temporadas.

| TEMPORADA | SITIO | ÍNDICE |             |                   |      |               |             |               |               |
|-----------|-------|--------|-------------|-------------------|------|---------------|-------------|---------------|---------------|
|           |       | MH     | LMW/<br>HMW | Relación<br>n-C16 | CPI  | Par/<br>impar | Pri/<br>Phy | n-C17/<br>Pri | n-C18/<br>Phy |
| Otoño     | PB    | C22    | 0,2         | -                 | 0,94 | 1,46          | 2,70        | 0,18          | 11,50         |
|           | PC    | C22    | 0,3         | -                 | 2,19 | 2,48          | 3,35        | 0,92          | 4,03          |
|           | PMdP  | C27    | 2,2         | 14,3              | 1,34 | 1,04          | 1,30        | 0,19          | 0,16          |
| Invierno  | PB    | C23    | 0,7         | -                 | 1,34 | 0,51          | 1,74        | 4,83          | 19,00         |
|           | PC    | C22    | 0,4         | -                 | 0,99 | 1,71          | 1,52        | 1,79          | 3,24          |
|           | PMdP  | C22    | 2,4         | 9,9               | 1,43 | 1,32          | 1,24        | 1,21          | 1,43          |
| Primavera | PB    | C22    | 0,4         | -                 | 1,60 | 1,64          | 4,66        | 1,37          | 10,32         |
|           | PC    | C19    | 0,4         | -                 | 2,09 | 0,61          | 1,09        | 1,36          | 0,62          |
|           | PMdP  | C19    | 3,6         | 9                 | 0,96 | 0,91          | 1,41        | 1,26          | 1,62          |
| Verano    | PB    | C22    | 0,2         | -                 | 2,13 | 1,99          | 0,35        | 1,03          | 2,14          |
|           | PC    | C22    | 0,4         | -                 | 2,09 | 1,53          | 0,40        | 1,92          | 0,69          |
|           | PMdP  | C22    | 0,6         | -                 | 0,75 | 2,00          | 1,21        | 0,37          | 0,61          |

MH: Hidrocarburo principal; LMW/HMW: Hidrocarburos de bajo/alto peso molecular; Relación n-C16:  $\sum n\text{-alcanos}/n\text{-C16}$ ; CPI: Índice de preferencia de carbono; Par/impar: Relación par/impar; Pri/Phy: Relación Pristano/Fitano; n-C17/Pri: n-C17/Pristano; n-C18/Phy: n-18/Fitano. PB: Playa Brusquitas; PC: Planta Camet; PMdP: Puerto Mar del Plata.

### Evaluación del origen de los hidrocarburos aromáticos

Respecto a los índices de evaluación del posible origen de los HAPs en los sedimentos, solo se pudo calcular el BaA/228 de PC en otoño y primavera y de PMdP en otoño, que fue, en todos los casos, mayor que 0,35. Los índices de evaluación del posible origen de los HAPs

presentes en *B. rodriguezii* de los sitios de estudio a lo largo de las distintas temporadas se detallan en la Tabla I.12. El índice BaA/228 fue mayor que 0,35 en todos los sitios y temporadas excepto en PMdP durante el invierno y primavera. Los valores observados para el índice FI/(FI + Py) fueron mayores que 0,5 mientras que para Ant/(Ant + Phe) fueron mayores que 0,1.

**Tabla I.12.** Valores de los índices de evaluación de hidrocarburos aromáticos en *Brachidontes rodriguezii* de los sitios de estudio a lo largo de las distintas temporadas.

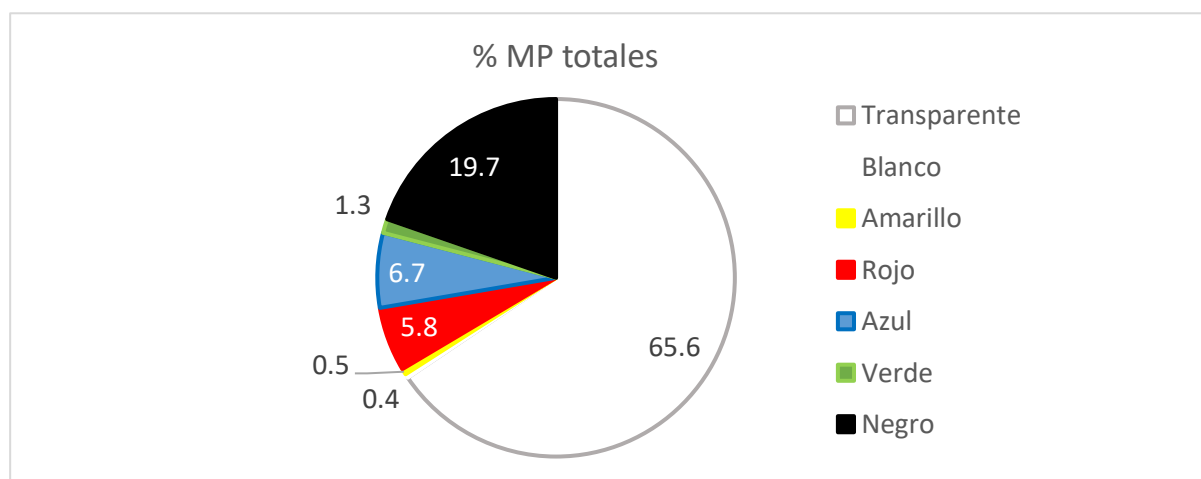
| TEMPORADA | SITIO | INDICE  |              |                 |
|-----------|-------|---------|--------------|-----------------|
|           |       | BaA/228 | FI/(FI + Py) | Ant/(Ant + Phe) |
| Otoño     | PB    | 0,96    | -            | 0,98            |
|           | PC    | -       | -            | 0,96            |
|           | PMdP  | 0,49    | 0,90         | 0,85            |
| Invierno  | PB    | 0,41    | 0,51         | 0,30            |
|           | PC    | 0,55    | 0,76         | 0,92            |
|           | PMdP  | 0,17    | 0,84         | 0,74            |
| Primavera | PB    | -       | -            | -               |
|           | PC    | 0,47    | -            | -               |
|           | PMdP  | 0,03    | 0,85         | 0,19            |
| Verano    | PB    | 0,89    | 0,88         | 0,43            |
|           | PC    | -       | -            | 0,84            |
|           | PMdP  | 0,91    | 0,88         | -               |

BaA/228: Benzo(a)antraceno/(benzo(a)antraceno + criseno); FI/(FI + Py): Fluoranteno/(fluoranteno + pireno); Ant/(Ant + Phe): Antraceno/(antraceno + fenantreno). PB: Playa Brusquitas; PC: Planta Camet; PMdP: Puerto Mar del Plata.

## 1.2.5 Microplásticos en mejillines

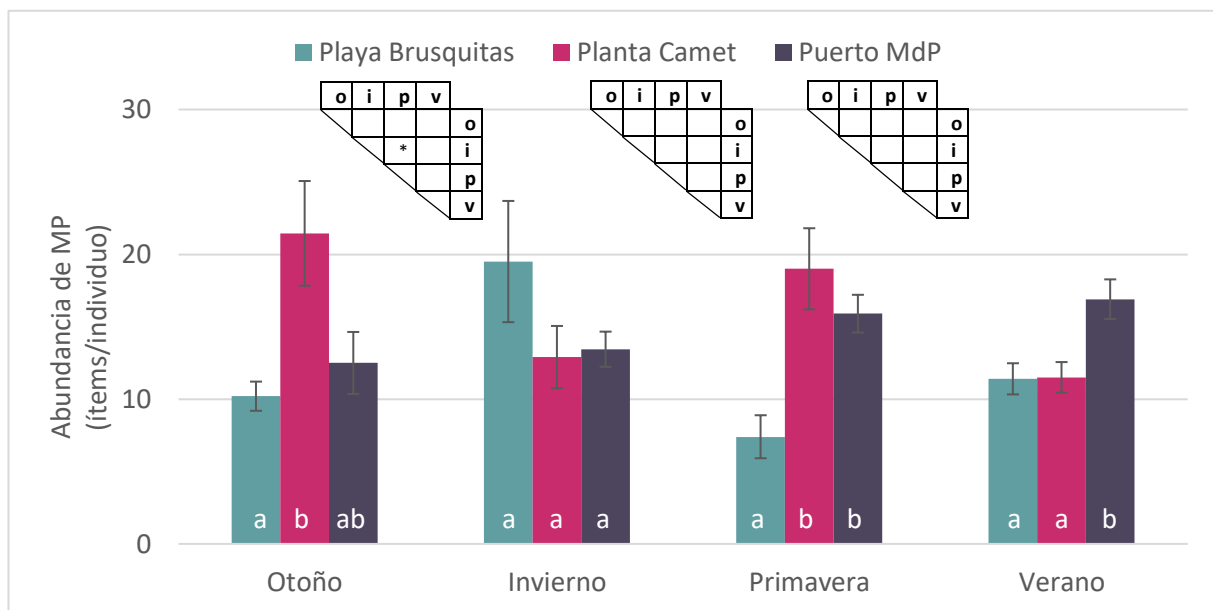
La eficiencia en la digestión fue de 98% en promedio para todas las muestras. Se encontró la presencia de microplásticos (MP) en la masa visceral de todos los ejemplares de *B. rodriguezii* de los distintos sitios y temporadas analizados. La abundancia total de MP fue de  $14,32 \pm 0,92$  ítems/individuo y de  $83,22 \pm 7,82$  ítems/g ph de masa visceral (media  $\pm$  EE, n = 120). La abundancia total de MP fue de  $12,13 \pm 1,92$  en PB, de  $16,08 \pm 5,57$  en PC y de

14,84  $\pm$  2,44 en PMdP ítems/individuo y de 97,53  $\pm$  15,42 en PB, de 75,23  $\pm$  15,05 en PC y de 75,96  $\pm$  12,49 en PMdP ítems/g ph de masa visceral (media  $\pm$  EE). Todos los ítems de MP observados correspondieron a la categoría fibras, el transparente fue el color más abundante (65,6 %), y el menos abundante el fue el color blanco (0,4 %) (Figura I.6).



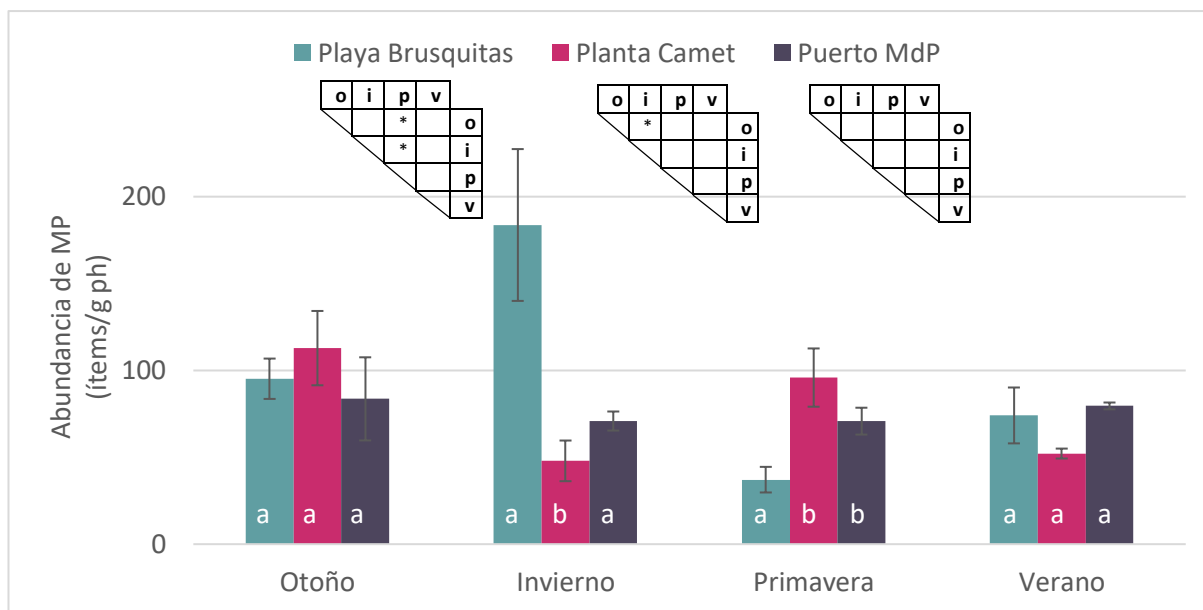
**Figura I.6.** Porcentajes de los distintos colores de microplásticos (% MP totales) encontrados en la masa visceral de los ejemplares de *Brachidontes rodriguezii* de todos los sitios y temporadas analizados. n = 120.

La abundancia de MP en los distintos sitios y temporadas estudiados, expresados como ítems por individuo (media  $\pm$  EE), se muestran en la Figura I.7. En otoño, la abundancia de MP fue mayor en los ejemplares recolectados en PC que en PB (Figura I.7; K-W, H = 7,14;  $p < 0,05$ ), aunque la abundancia entre estos dos sitios no presentó diferencias significativas con PMdP. En invierno no se observaron diferencias significativas entre los sitios (Figura I.7; K-W, H = 1,50;  $p > 0,05$ ). En primavera, la abundancia de MP fue significativamente mayor en los ejemplares de PC y PMdP en comparación con PB (Figura I.7; K-W, H = 12,56;  $p < 0,05$ ). En verano, la abundancia fue significativamente mayor en PC en comparación con PB y PMdP (Figura I.7; K-W, H = 10,71;  $p < 0,05$ ). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las temporadas únicamente en PB, donde la abundancia de MP en invierno fue significativamente mayor que la de primavera (Figura I.7; K-W, H = 9,76;  $p < 0,05$ ).



**Figura I.7.** Abundancia de MP (ítems/individuo) en la masa visceral de *Brachidontes rodriguezii* para los distintos sitios y temporadas de estudio (media  $\pm$  EE). Letras distintas representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los sitios en cada temporada. Matrices triangulares con asteriscos representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las temporadas para cada sitio. o: Otoño; i: Invierno; p: Primavera; v: Verano.

Al analizar la abundancia de MP en relación con el peso de los mejillines (ítems/g ph), si bien los patrones fueron similares a lo observado en la abundancia por individuo, la significancia fue diferente (Figura I.8). En otoño no se observaron diferencias significativas entre los sitios (Figura I.8; K-W,  $H = 2,03$ ;  $p > 0,05$ ). En invierno, la abundancia de MP fue menor en los ejemplares recolectados en PC que en los de PB y PMdP (Figura I.8; K-W,  $H = 11,85$ ;  $p < 0,05$ ). En primavera, la abundancia fue significativamente mayor en los ejemplares de PC y PMdP en comparación con PB (Figura I.8; K-W,  $H = 10,02$ ;  $p < 0,05$ ). En verano no se observaron diferencias significativas entre los sitios (Figura I.8; K-W,  $H = 3,11$ ;  $p > 0,05$ ). Por otro lado, al comparar la abundancia de MP de cada sitio a lo largo de las temporadas, en PB se observó que la abundancia de MP en primavera es significativamente menor que en otoño e invierno (Figura I.8; K-W,  $H = 17,38$ ;  $p < 0,05$ ). En PC la abundancia de MP en otoño fue significativamente mayor que en invierno (Figura I.8; K-W,  $H = 12,30$ ;  $p < 0,05$ ). En PMdP no se observaron diferencias entre temporadas (Figura I.8; K-W,  $H = 0,84$ ;  $p > 0,05$ ).



**Figura 1.8.** Abundancia de MP (ítems/g peso húmedo) en la masa visceral de *Brachidontes rodriguezii* para los sitios y temporadas de estudio (media  $\pm$  EE). Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios en cada temporada ( $p < 0,05$ ). Matrices triangulares con asteriscos representan diferencias significativas entre las temporadas para cada sitio ( $p < 0,05$ ). o: Otoño; i: Invierno; p: Primavera; v: Verano.

## 1.3 DISCUSIÓN

Para entender los efectos de la contaminación sobre los ecosistemas marinos, primero es necesario distinguir su naturaleza y cuál es su origen. Dentro de los contaminantes más importantes encontramos a los hidrocarburos derivados del petróleo y los metales que aportan las industrias, el tránsito marítimo, las descargas de residuos cloacales, etc. y su persistencia y efectos tóxicos son bien conocidos (Collins et al., 2011). Además, en los últimos años han surgido contaminantes de preocupación emergente como los microplásticos (Wang et al., 2021).

El petróleo está formado por una mezcla compleja de compuestos que generalmente se usan como marcadores químicos en sedimentos y en bivalvos. Entre ellos encontramos los hidrocarburos alifáticos (HAs) (n-alcanos, alcanos cíclicos y ramificados, isoprenoides, hopanos y esteranos), los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y las mezclas de compuestos no resueltas (MNR) (Lopes et al., 2012). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés) junto con la Organización Mundial de la Salud han reconocido como contaminantes prioritarios a 16 compuestos derivados de la fracción aromática (ATSDR, 1995). De muchos de estos HAPs, se conocen sus efectos carcinogénicos y mutagénicos en mamíferos, por lo que su acumulación en las cadenas tróficas es de vital importancia. Además, debido al carácter hidrofóbico, todos estos compuestos tienden a adsorberse a los sedimentos por lo que pueden reflejar su acumulación a largo plazo.

El área costera de Mar del Plata es una zona de alto tránsito marítimo debido a la presencia del puerto pesquero y de carga y descarga de petróleo, pero a pesar de ser un área potencialmente amenazada por este tipo de contaminante existen escasos estudios sobre su acumulación en sedimentos (Albano et al., 2013; Laitano et al., 2015) y ninguno en especies filtradoras como los bivalvos. Además, en la zona se encuentra el emisario submarino donde se descargan los desechos de la planta de tratamiento de aguas residuales. Estas descargas pueden potencialmente contaminar el ecosistema acuático. Es por ello que en este trabajo se

focalizó en estudiar la acumulación de HAs, HAPs y metales tanto en sedimento como en *B. rodriguezii* y tratar de entender el origen de cada compuesto.

En sedimentos que no están contaminados se encuentran valores de hidrocarburos alifáticos totales por debajo de los 10 µg/g ps (Muniz et al., 2004; Albano et al., 2013). En este trabajo, si bien se detectó la presencia de  $\Sigma$ HAs en todos los sitios y temporadas, los valores fueron inferiores a este límite (107,7-889,4 ng/g ps) por lo cual se puede inferir que ninguno de estos sedimentos está contaminado por estos compuestos. Esto puede deberse a que los sitios estudiados presentan un ambiente aeróbico y con altas condiciones hidrodinámicas, evidenciado por los bajos porcentajes de materia orgánica encontrados en los sedimentos, lo que favorecería los procesos de biodegradación de estos compuestos (Muniz et al., 2004). Aun así, se estudió el posible origen de estos compuestos, aunque los índices estudiados no indicaron un patrón claro. El índice  $P_{ry}/P_{hy}$  usualmente es mayor en muestras cuyo origen es biogénico, y esto es lo que se observó en este estudio, incluso se observaron valores extremadamente altos, como en PC durante el invierno. Esto se encuentra reforzado por los bajos valores en el índice par/impar, ya que las plantas vasculares tienen un número de n-alcenos impares hasta 8 veces mayor que los pares (Volkman et al., 1992). Sin embargo, los bajos valores en el índice n-C18/ $P_{hy}$  indicaron lo contrario, niveles significativos de petróleo. En resumen, en la mayoría de las muestras algunos índices indicaron la presencia de hidrocarburos de origen biogénico mientras que otros índices indicaron que el origen de estos es antrópico por lo que es posible que los HAs encontrados en los sedimentos, en todos los sitios y temporadas, sean de origen mixto.

En general, en este estudio, la tendencia de acumulación de HAs difirió en sedimentos y mejillín del mismo sitio y temporada. Esto sugiere que los mejillines no están directamente expuestos a los HAs adsorbidos en los sedimentos, por lo que podrían estar incorporándolos a través de las partículas suspendidas en la columna de agua mediante filtración. Por otro lado, los valores observados en la biota son de hasta tres órdenes superiores a los sedimentos (6583-260396 ng/g ps) evidenciando un proceso de bioacumulación. Al estudiar su origen (analizando los índices en conjunto) se pudo observar que en PB la mayor parte de los HAs acumulados en el mejillín provienen de fuentes naturales. Lo mismo sucede con PC, aunque

algunos de los índices indicaron un origen antrópico. En ambos sitios las concentraciones de HAs en el mejillín se mantuvieron estables al largo de todas las temporadas y no superaron los 21,4 µg/g ps, valores similares a lo reportado en otros sitios considerados no contaminados (Rowland y Volkman, 1982). En PMdP se observó un patrón diferente, con la mayoría de los índices indicando una acumulación de HAs de origen petrogénico. En áreas contaminadas con petróleo los n-alcanos con el tiempo terminan degradándose mientras que las mezclas no resueltas (MNR) suelen acumularse (Granby y Spliid, 1995). La proporción entre las MNR y los n-alcanos reflejan los procesos de degradación ambiental a los que están sometidos los hidrocarburos (Volkman et al., 1992), dado que los alcanos de cadena lineal se degradan más fácilmente que el resto, por lo que esta relación nos puede indicar si la contaminación es reciente ( $\approx 1$ ) o antigua ( $> 1$ ) (Lopes et al., 2012). En los ejemplares de PMdP, se encontraron los mayores valores de n-alcanos y además altas concentraciones de MNR, lo que indicaría que la población presente en el puerto está expuesta a hidrocarburos derivados del petróleo. Durante todas las temporadas, en el mejillín, se registraron concentraciones de MNR entre 251,5 µg/g ps y 1132,1 µg/g ps, valores similares a lo reportado en mejillones del Mar del Norte expuestos a emisarios de refinerías de petróleo (Rowland y Volkman, 1982). El hecho de que las MNR sean el principal contribuyente al total de hidrocarburos alifáticos podría indicar la capacidad de los organismos para incorporar una gran concentración de diferentes compuestos y de metabolizar estos MNR más lentamente (Massara Paletto et al., 2008). Esta acumulación de MNR es un indicio de que la población presente en el puerto de Mar del Plata fue expuesta en el pasado a algún tipo de derrame de petróleo.

La mayoría de los HAPs encontrados en el ambiente marino tienen un origen antrópico, y pueden ser introducidos al ambiente a través de procesos de combustión (origen pirogénico) o derrames directos de petróleo (origen petrogénico). Es por ello que se desarrollaron diversos índices, basados en la concentración de los componentes individuales, para poder discernir su origen (Baumard et al., 1998b). En este trabajo, el uso de estos índices en sedimentos fue limitado debido a la ausencia de la mayoría de los compuestos que los componen. El índice BaA/228, que solo se pudo calcular para PC en otoño y primavera y para PMdP en otoño, nos indica que los HAPs acumulados en sedimentos son de origen pirogénico. Los valores de

SQG-Q calculados para la  $\Sigma$ HAPs prioritarios nos indican que los sedimentos de los tres sitios estudiados no se encuentran contaminados. Sin embargo, al analizar estos compuestos individualmente podemos observar que en PC hay valores moderados de contaminación por benzo(a)pireno y dibenceno(ah)antraceno. En PMdP la mediana de  $\Sigma$ HAPs prioritarios (162,21 ng/g ps) se encuentra debajo del valor ERL, lo cual contrasta con el estudio realizado por Laitano y colaboradores (2015) en donde encontraron en el puerto de Mar del Plata una concentración máxima de  $\Sigma$ HAPs prioritarios de 17093,7 ng/g ps. Igualmente, hay que considerar que durante el invierno y la primavera no se pudo realizar ninguna cuantificación debido a la poca cantidad de muestra.

En general, la tendencia en la composición de los diferentes HAPs encontrados difirió en sedimentos y mejillín del mismo sitio y temporada. Esto indicaría, al igual que para los HAs, que los mejillines no están directamente expuestos a los contaminantes adsorbidos en el sedimento, sino que los estarían incorporando a través de las partículas suspendidas en la columna de agua. En todos los sitios y temporadas se encontraron HAPs y al analizar el origen de estos compuestos los valores obtenidos indicaron que el origen principal de los HAPs acumulados en los mejillines es pirogénico. Es posible que estas emisiones se originen tanto por la combustión interna de motores (automotores, barcos) como por la combustión de los combustibles fósiles usados en las industrias cercanas. Por otro lado, en los ejemplares de PMdP, durante el invierno y la primavera, el índice BaA/228 indicó una acumulación de HAPs cuyo posible origen sea petrogénico, es decir producto de algún tipo de derrame de hidrocarburos local. Al igual que lo observado para  $\Sigma$ HAs, los mayores valores de  $\Sigma$ HAPs fueron encontrados en los mejillines de PMdP, además de ser el único sitio con concentraciones de MNR. También, en PMdP, durante el verano y el otoño, fue donde se encontraron concentraciones de benzo(a)pireno, uno de los componentes más carcinogénicos del petróleo (ATSDR, 1995). Este compuesto se metaboliza a una tasa diferente produciendo un patrón de bioacumulación distinto al resto (Baumard et al., 1999), lo que refuerza la hipótesis de un posible derrame en los meses anteriores.

Los valores de  $\Sigma$ HAPs encontrados en este estudio superan ampliamente a lo informado para especies similares. Arias y colaboradores (2009) realizaron una revisión de

los HAPs encontrados en diferentes especies de bivalvos alrededor del mundo. Por ejemplo, en diferentes zonas de la costa europea se han reportado valores máximos de  $\Sigma$ HAPs de 2420 ng/g ps en una zona altamente urbanizada de la bahía de Arcachon (Francia) para *Mytilus galloprovincialis* (Baumard et al., 1999) o de 11670 ng/g ps en *M. edulis* recolectados en el puerto de Reikjavik (Islandia) (Skarphéðinsdóttir et al., 2007). Las tasas de alimentación y respiración dependen de la talla de los individuos, lo que influye en las tasas de absorción de los contaminantes. Los individuos más pequeños pueden tener una tasa de alimentación más alta, lo que puede conducir a un factor de acumulación más alto (Maioli et al., 2010). *Brachidontes rodriguezii* es una especie de tallas promedio inferiores a las especies de mejillones mayormente estudiadas, esta podría ser una explicación de los altos valores encontrados en este estudio. Además, los valores encontrados en toda el área aquí estudiada, superan a lo informado para *B. rodriguezii* en el estuario de Bahía Blanca (Arias et al., 2009). Allí se encontró un valor máximo de  $\Sigma$ HAPs 1597 ng/g ps considerándose un sitio de moderada contaminación. Por lo que podemos concluir que PMdP es una zona altamente contaminada por HAPs, mientras que las concentraciones encontradas en PB y PC se encuentran dentro de los valores esperados para zonas de contaminación moderada.

Los metales pueden ingresar al ambiente acuático a través de fuentes naturales, como la meteorización, los incendios forestales o vulcanismo, o fuentes de origen antrópico. Entre estas últimas encontramos a los efluentes industriales, mineros y domésticos, lixiviados desde vertederos de desechos sólidos, las zonas rurales con uso intensivo de pesticidas (Hamed y Emara, 2006). También, la quema de combustibles fósiles y basura y las emisiones de las industrias liberan metales a la atmosfera que en última instancia son depositados en los ambientes terrestres y acuáticos (Collins et al., 2011). Los metales, al ingresar al ambiente marino pueden quedar atrapados en los sedimentos y bioacumularse en los bivalvos.

En este trabajo las concentraciones de metales detectadas en sedimentos se encontraron por debajo de los umbrales establecidos para ambientes contaminados (GESAMP, 1982) presentando valores de SQG-Q < 0,1. Sin embargo, la acumulación de metales observada en sedimentos difirió de lo observado en el mejillín. Esta diferencia también ha sido observada en otras especies de mitílidos en Argentina (Giarratano et al.,

2010; Duarte et al., 2011; Buzzi et al., 2017). En los ejemplares de *B. rodriguezii* recolectados en PB y PC durante todas las temporadas (excepto en PC durante la primavera), se encontró cadmio aun cuando no fue detectado en sedimentos. Esta diferencia podría deberse a la mayor solubilidad del Cd en sistemas oxidados por lo que es posible que predominen las formas disueltas, disponibles para la biota (Gil et al., 2006). Las mayores concentraciones de Cd se encontraron en PB durante el otoño (5,8 µg/g ps) y el invierno (7,3 µg/g ps). Estos valores fueron superiores a lo previamente reportado en la misma especie en el estuario de Bahía Blanca (Oliva et al., 2017; Buzzi y Marcovecchio, 2018) y en *Mytilus edulis chilensis* en Ushuaia (Argentina) (Giarratano y Amin, 2010; Duarte et al., 2011; Giarratano et al., 2011). Si bien en uno de los sitios del estuario estudiado por Buzzi y colaboradores durante el verano observaron un valor de Cd similar al de PB en otoño, las concentraciones de otros metales también fueron altas en comparación con los demás sitios y temporadas. Los autores señalaron que esos altos valores podía estar relacionado a eventos puntuales de floraciones de fitoplancton en la zona que potenciarían la incorporación de metales (Buzzi et al., 2017). Las altas concentraciones de Cd encontradas en PB pueden deberse a la presencia de la desembocadura del arroyo Las Brusquitas cuya cuenca abarca gran parte del partido de Gral. Pueyrredón y atraviesa una zona de alta actividad agrícola y ganadera que podría estar aportando por esorrentías fertilizantes fosfatados que contienen Cd (De Marco et al., 2020). Según lo establecido por la Comunidad Económica Europea (CEE, 2002) y el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Argentina (SENASA, 2000) el límite máximo de Cd en moluscos para consumo humano es de 1 µg/g peso húmedo. Los valores máximos encontrados en PB superan este límite, 1,6 µg/g ph (otoño) y 1,4 µg/g ph (invierno) y, aunque la especie no se utiliza para consumo humano, deberían profundizarse los estudios sobre los posibles peces predadores de *B. rodriguezii*. Los valores encontrados en ejemplares de PC (0,9-2,3 µg/g ps) fueron menores que los de PB, y su aporte podría estar dado por las emisiones que genera la planta de tratamientos de aguas residuales de la zona. Esto se ve reforzado por el mayor porcentaje de materia orgánica observada en PC.

El plomo, si bien fue detectado en el sedimento, no se encontró a concentraciones por encima del límite de detección en el mejillín. Este mismo comportamiento fue observado en

otros estudios donde se detectó Pb en sedimentos y no en tejidos de *M. edulis* (Giarratano y Amin, 2010) y *B. rodriguezii* (Buzzi et al., 2017). En este último trabajo proponen que el Pb es transferido de los tejidos blandos al biso con mayor efectividad, en contraste con lo que ocurre con el Cd, que se acumula principalmente en la glándula digestiva. Dado que en este trabajo el biso de *B. rodriguezii* fue descartado del análisis, esta podría ser una explicación a la ausencia de Pb. En el caso del cromo, uno de los metales con mayor toxicidad reportada para la biota, por un problema metodológico no pudo ser cuantificado en sedimentos, pero se encontraron concentraciones considerables en PB en todas las temporadas (menos otoño) y en PC durante el invierno. Estos valores se encontraron dentro del intervalo observado en *M. edulis* en una zona portuaria de Río Negro (Argentina) (Sabatini et al., 2023). Asimismo, salvo la excepcionalmente alta concentración observada en PB en verano (10,78 µg/g ps), los demás valores fueron similares a los observados en programas de monitoreo de largo plazo en la costa del País Vasco (España) (Franco et al., 2002; Solaun et al., 2013). El zinc fue detectado en casi todas las muestras de sedimentos, excepto durante el invierno en PB y PC, y en los mejillines de todos los sitios y temporadas. Esto último se debe a que es un elemento esencial que suele ser incorporado mediante la alimentación, pero que en concentraciones elevadas puede ser tóxico (Duarte et al., 2011).

La NOAA estableció una clasificación de la calidad ecológica de los ecosistemas costeros basada en la concentración de metales encontrados en masa visceral de mejillones (Kimbrough et al., 2008). Allí se establecen 3 categorías: baja, media y a alta contaminación dependiendo de la concentración del metal. Según esta clasificación las poblaciones de *B. rodriguezii* de los tres sitios estudiados presentan niveles bajos de contaminación por metales, excepto en PB durante el otoño y el invierno donde la contaminación por Cd es moderada. Las diferencias en las tendencias de los distintos contaminantes analizados en las muestras de sedimento y su bioacumulación en los mejillines, destacan la importancia de incluir, en futuros estudios, análisis de muestras de agua, algo que originalmente estaba planeado en este trabajo y no pudo realizarse por impedimentos metodológicos. Si bien pudieron observarse ciertas tendencias de acumulación de los contaminantes analizados y el

presente trabajo brinda una primera caracterización de los ambientes estudiados, en futuros monitoreos sugerimos aumentar el tamaño muestral en las distintas matrices a analizar.

Respecto a la contaminación generada por microplásticos, en este estudio se observó la presencia de fibras en todos los ejemplares analizados. Esto coincide con lo reportado en otros estudios de bivalvos filtradores, en donde las fibras es el tipo de MP más abundante (Brâte et al., 2018b; Qu et al., 2018; Hermabessiere et al., 2019; Truchet et al., 2021). Esto podría deberse, por un lado, a que los mejillones ingieren y retienen más fácilmente las partículas pequeñas y, por otro lado, a la mayor tendencia de las fibras a enredarse dentro de las estructuras de alimentación (Shimeta y Jumars, 1991; Murray y Cowie, 2011; Kolandhasamy et al., 2018).

La clasificación de los MP según el color es útil para identificar potenciales fuentes de ingreso. Las fibras pueden presentar colores que difieren del color original como producto del desgaste de los textiles durante el lavado o por la acción climática (Bissen y Chawchai, 2020). Esto podría ser una explicación a la gran abundancia de fibras transparentes (65,6%) observadas en todas las muestras.

A pesar de que internacionalmente los estudios relacionados con la acumulación de MP en bivalvos son numerosos (Li et al., 2019), en Argentina, aún son escasos habiéndose estudiado solo en 5 especies: *Crassostrea gigas* (Fernández Severini et al., 2019), *Aulacomya atra* (Ríos et al., 2020), *Mytilus chilensis* (Pérez et al., 2020), *Amarillodesma mactroides* y *B. rodriguezii* (Truchet et al., 2021). En ejemplares de *B. rodriguezii* recolectados en Claromecó (al sur de la Provincia de Buenos Aires) se registró una abundancia promedio  $0,17 \pm 0,07$  fibras/g ph (Truchet et al., 2021). Este valor es altamente inferior a lo observado en este estudio, en donde la abundancia promedio de MP fue de  $83,22 \pm 7,82$  ítems/g ph. Esta diferencia se debe principalmente a que, en el primer trabajo, se toma en cuenta el peso de mejillín entero (valva incluida) mientras que aquí los resultados se informan por peso húmedo de la masa visceral (sin la valva). Además, Truchet y colaboradores (2021) utilizaron muestras agrupadas y, por lo tanto, informan valores medios en todos los individuos, tengan o no MP. Por todo esto, ambos resultados no serían comparables. La

abundancia media total de MP encontrada en los ejemplares de *Mytilus chilensis* recolectados en las costas del canal de Beagle (Ushuaia) ( $8,6 \pm 3,53$  ítems/individuo) (Pérez et al., 2020) es inferior a lo encontrado en este estudio ( $14,32 \pm 0,92$  ítems/individuo). A pesar de estas diferencias, en ambos estudios los valores son mayores que los reportados para otras especies de bivalvos presentes en otras regiones (para un resumen ver Li et al., 2019; Reguera et al., 2019). Esto posiblemente se deba a que, en ambos estudios, se encontraron MP en la mayoría de los ejemplares analizados (98%-100%) a diferencia de lo reportado en otras regiones. Por ejemplo, Digka y colaboradores (2018), encontraron en *M. galloprovincialis* recolectados en el mar Mediterráneo, una abundancia de  $1,9 \pm 0,2$  ítems/individuo solo en el 46,3% de los ejemplares analizados.

Respecto a la distribución espacial, en PB se observaron la menor abundancia total y por temporada, excepto durante el invierno. En esta zona, la temporada con mayores precipitaciones corresponde al otoño, por lo que el caudal del arroyo Las Brusquitas aumenta llegando a su flujo máximo (De Marco et al., 2020). Como es sabido, los ríos son el nexo principal entre la tierra y el mar, descargando altas cantidades de contaminantes al océano, entre ellos los MP. El aumento en el volumen de la descarga de este arroyo durante el otoño podría estar aumentando la cantidad de MP en el intermareal, y en consecuencia la acumulación de MP en *B. rodriguezii* en la temporada siguiente.

En PC se observó la mayor abundancia total. Estudios recientes han demostrado que las plantas de tratamiento de aguas residuales tienen un rol importante en la liberación de MP al ambiente (Browne et al., 2011; Sun et al., 2019). Las ropa sintética, fabricada generalmente con nylon o el poliéster, pueden arrojar miles de fibras a las aguas residuales durante un ciclo de lavado (Browne, 2015). Por ejemplo, se estimó que 6 kg de tela sintética, luego de un ciclo de lavado en lavarropas automático, pueden liberar unas 700.000 fibras (Napper y Thompson, 2016). Si bien las plantas de tratamientos pueden retener algunas de estas partículas, no están diseñadas para removerlas, por lo que la mayoría de ellas pasan de largo, terminando en los cuerpos de agua y finalmente acumulándose en el ambiente y en la biota (Browne et al., 2011; Murphy et al., 2016). Solamente en China, a través de las aguas residuales domésticas,

se liberan por día al ambiente alrededor de  $9,1 \times 10^{10}$  MP (Tang et al., 2020). Mar de Plata es el principal balneario del país, por lo que durante las vacaciones de verano e invierno aumenta la población y, en consecuencia, aumenta el volumen de las descargas de los efluentes cloacales. Esta marcada estacionalidad se ve reflejada en el aumento de MP que se observa en la población presente en PC durante primavera y otoño, es decir al finalizar el periodo vacacional. El sector pesquero es una de las principales fuentes de contaminación por MP, principalmente por la pérdida o abandono de sogas y redes de pesca. Estas sogas o redes al desgastarse por la acción climática (rayos UV, vientos, etc.) pueden liberar fibras sintéticas al medio acuático. Esto podría explicar las altas abundancias de MP observadas en los ejemplares recolectados en PMdP principalmente durante la primavera y el verano.

De todas formas, dado que las cantidades de MP aquí observadas han sido muy superiores a las observadas en estudios previos, no podemos descartar una sobreestimación en la acumulación registrada. Se prevee analizar la composición de las partículas contabilizadas mediante el análisis químico a partir de submuestras de los filtros mediante microscopia confocal RAMAN en el Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física – INQUIMAE, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN-UBA) para contar con una evaluación más precisa.

Con todos los resultados presentados en este trabajo podemos concluir que las tres zonas estudiadas presentan diferentes niveles y tipos de contaminación y, PMdP, es la zona con mayores niveles de contaminación por hidrocarburos y en menor medida por microplásticos. La zona de PC presenta niveles moderados de contaminación por hidrocarburos mientras que la cantidad de microplásticos es muy alta. Por último, si bien se encontraron bajas concentraciones de hidrocarburos y microplásticos en el mejillín, se pudo comprobar que PB es una zona para tomar como referencia, pero habría que profundizar los estudios referentes a la acumulación de metales.

En base a los resultados observados, podemos considerar a *B. rodriguezii* como un buen indicador de contaminación por hidrocarburos, metales y microplásticos. Dado que las condiciones de cada ambiente pueden cambiar con el tiempo se sugiere establecer programas que monitoreen la contaminación espacial y temporal usando al mejillín como especie

centinela y bioindicadora. De esta manera se podrán identificar las áreas más vulnerables y de alto riesgo toxicológico para otras especies marinas.

**CAPÍTULO 2. Enfoque de múltiples biomarcadores de  
contaminación y respuestas fisiológicas en *Brachidontes  
rodriguezii* en ambientes con distintos tipos de impacto a lo  
largo del año**

## 2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1.1 Respuestas de biomarcadores bioquímicos

Para evaluar el estrés oxidativo y la biotransformación, se midió la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), junto con la enzima de metabolismo de biotransformación de fase II, la glutatión-S-transferasa (GST) en las muestras criopreservadas de *B. rodriguezii* (Grupo 6, n = 7 por sitio para cada temporada). Las mediciones se realizaron bajo la supervisión de la Dra. Sabrina Lavarías quien facilitó el equipamiento necesario en el Instituto de Limnología de La Plata "Dr. Raúl A. Ringuelet" (ILPLA). CONICET-Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Argentina.

#### **Preparación de los homogenatos para las determinaciones enzimáticas**

Se disecaron los individuos de *B. rodriguezii* separando la masa visceral de las valvas con un bisturí. Se pesó la masa visceral en una balanza de precisión (0,01 g) (Denver Instrument APX-200) y se la homogenizó con una solución de *buffer* Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) en relación 1:6 p/v. Los homogenatos fueron centrifugados a 10000 xg en una centrífuga refrigerada (Eppendorf Centrifuge 5804 R) a 4 °C durante 15 min. El sobrenadante se recolectó en tubos eppendorf y se guardó en el freezer (-20°C) hasta su análisis. Todos los pasos previamente mencionados fueron realizados en frío. La concentración total de proteínas fue determinada por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

#### **Mediciones de la actividad enzimática de SOD, CAT y GST**

La actividad enzimática se determinó utilizando un espectrofotómetro (Metrolab 1700 Uv Vis) a la longitud de onda correspondiente para cada enzima. Se resume a continuación el protocolo utilizado para cada enzima:

Superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1). La actividad de SOD se midió de acuerdo a Marklund y Marklund (1974). El método se basa en la inhibición de la autooxidación del

pirogalol (26 mM, pH 2) seguida espectrofotométricamente a 420 nm. La reacción se llevó a cabo con *buffer* Tris-cacodilato 50 mM (pH 8,8) en un volumen final de 1 mL. Una unidad SOD se definió como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50 % de la oxidación autocatalítica de pirogalol/min. La actividad específica se expresó como unidades de SOD por mg de proteína total.

Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6). La actividad de CAT se determinó siguiendo la disminución de la absorbancia a 240 nm debido a la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) (Aebi, 1984). La mezcla de reacción fue 1 mL de *buffer* de fosfato de potasio 50 mM (pH 7). Una unidad CAT se definió como la cantidad de enzima que cataliza 1 μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min. La actividad específica se expresó como unidades de CAT por mg de proteína total.

Glutación-S-transferasa (GST, EC 2.5.1.18). La actividad de GST se midió según el método descrito por Habig y colaboradores (1974) usando 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) como sustrato. La reacción se llevó a cabo con *buffer* fosfato 0,1 M (pH 6,5), CDBN 1 mM y GSH 1 mM, en un volumen final de 1 mL. Una unidad de GST se definió como la cantidad de enzima requerida para conjugar GSH con 1 μmol de CDBN/min, determinada a 340 nm. La actividad específica se expresó como unidades de GST por mg de proteína total.

Para una descripción más detallada de todos los protocolos previamente mencionados, ver el Anexo.

## 2.1.2 Respuestas de biomarcadores celulares en glándula digestiva

### **Acumulación intracelular de lípidos neutros y lipofuscinas**

Se tomaron 4 glándulas digestivas (de cada sitio y temporada) almacenadas a -80 °C (Grupo 5) y se cortaron a 9 μm de espesor utilizando un crióstato Leica CM1850 (Leica Instruments GmbH, Nusslock, Alemania). Los cortes fueron almacenados a -20 °C hasta su procesamiento. La evaluación del contenido de lipofuscinas (LF) se realizó a través de la reacción histoquímica de Schmorl (Lowe et al., 1981). Para ello, las secciones cortadas en crióstato fueron fijadas en formol calcio durante 15 min a 4 °C y luego enjuagadas con agua destilada. Se las incubó en un medio de reacción que contenía cloruro férrico 1 %, y

ferricianuro de potasio 1 % en relación 3:1, durante 5 min. Luego, se lavaron en ácido acético 1% durante 1 min, se enjuagaron con agua destilada y finalmente se montaron con glicerina.

Por otro lado, la evaluación de la acumulación de lípidos neutros (LN) se realizó a través de la reacción histoquímica de aceite rojo *Red Oil O* 1 % (Culling, 1974). Para ello, las secciones cortadas en el crióstato fueron fijadas en formol calcio durante 15 min a 4 °C, luego secadas a temperatura ambiente y lavadas en isopropanol 60 %. Posteriormente, las secciones se tiñeron con aceite rojo 1 % en isopropanol 60 % durante 20 min a temperatura ambiente. Luego, se lavaron en isopropanol 60 % y posteriormente en agua destilada. Para obtener contraste se tiñeron con *Fast Green FCF* 1 % (Sigma, F-7252) durante 20 min, y finalmente se montaron en glicerina.

Los cortes de ambas reacciones fueron observados con un microscopio óptico a 40 aumentos (AXIOPLAN 2 Zeiss®) y fotografiados con una cámara digital (Zeiss AXIOCAM HRc). Para calcular el área porcentual de la sección de tejido cubierta por LF y LN, las imágenes fueron procesadas con un sistema de análisis de imágenes (Image-Pro® Plus). Para corregir las ligeras diferencias en la intensidad de la tinción entre diferentes secciones, la segmentación se ajustó manualmente en la primera medición de una sección y luego se automatizó en el resto. Para una descripción más detallada de ambos protocolos, ver el Anexo.

### **Análisis autometalográfico para la detección de depósitos metálicos en las células de los túbulos de la glándula digestiva**

Los ejemplares del Grupo 4 (n = 10, por sitio y temporada) fueron fijados en formaldehído neutralizado en *buffer* (NBF) 10 % durante 24 h y luego conservados en alcohol (etanol) 70° hasta su utilización. Al disecarlos, se realizaron cortes transversales bajo un microscopio estereoscópico de manera de incorporar las branquias, tejido gonadal y la glándula digestiva en una sola sección histológica. Las muestras se deshidrataron usando una serie ascendente de concentraciones de alcohol y luego fueron incluidas resina de glicol-metacrilato (Leica Historesin®). Para una descripción más detallada del protocolo de inclusión, ver el Anexo. Finalmente, las muestras fueron cortadas en secciones de 5 µm con un

micrótopo electrónico (Leica® RM 2155) y se las dejó secar durante 24 h en estufa a 50 °C antes de ser utilizadas.

Los cortes fueron luego tratados con el kit *silver enhancing reagent* de AURION® (R-Gent SE-LM) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se preparó una mezcla de los reactivos revelador y potenciador en partes iguales y se aplicaron unas gotas de la misma sobre todas las muestras. Los cortes se mantuvieron en una cámara húmeda durante 20 min a temperatura ambiente y luego fueron lavados con agua destilada. Se realizó una contra coloración de hematoxilina-eosina y se montó con bálsamo de Canadá. Los cortes fueron finalmente observados con un microscopio óptico (AXIOPLAN 2 Zeiss®) y conservados siempre en cajas protegidos de la luz. La cuantificación de los depósitos metálicos BSD (por sus siglas en inglés de *Black Silver Deposits*) se realizó de acuerdo a Lowe y colaboradores (1981). Se utilizaron cortes provenientes de un experimento de exposición a plata (Ag) realizado por Jimeno-Romero y colaboradores (2017) como controles negativos (mejillones control en el experimento, sin exposición a Ag) y controles positivos (mejillones tratados en el experimento, expuestos a Ag 750 µg/L). Para una descripción más detallada del protocolo, ver el Anexo.

### 2.1.3 Respuestas de biomarcadores tisulares en la glándula digestiva y tejido gonadal

Para el análisis de las respuestas de biomarcadores tisulares en glándula digestiva y tejido gonadal, los cortes histológicos del Grupo 4 (n = 10 por sitio y temporada) fueron teñidos con hematoxilina-eosina (H-E). Para ello, los cortes fueron hidratados en agua destilada durante 10 min y luego coloreados con hematoxilina de Carazzi durante 15 min. Posteriormente al viraje en agua corriente y pasaje de agua destilada, se los coloreó con eosina alcohólica por 15 min. Luego, fueron deshidratados en una graduación alcohólica ascendente, secados y montados con bálsamo de Canadá (ver Anexo).

## **Análisis morfométrico de los túbulos digestivos**

La cuantificación de los cambios en la morfología de los túbulos digestivos se realizó estudiando distintos parámetros planimétricos de acuerdo a Bignell y colaboradores (2012). Los cortes histológicos teñidos con H-E fueron observados en un microscopio óptico (AXIOPLAN 2 Zeiss®) utilizando un objetivo de 40 aumentos. Se seleccionaron al azar 10 campos de glándula digestiva que fueron fotografiados con una cámara digital (Zeiss AXIOCAM HRC). Mediante un sistema de análisis de imágenes (Axio Vision Rel. 4.8) se dibujó un total de 50 túbulos por individuo. Se calculó la altura media del epitelio (MET por sus siglas en inglés; en  $\mu\text{m}$ ), el radio medio del lumen (MLR por sus siglas en inglés; en  $\mu\text{m}$ ) y el radio medio del túbulo o divertículo (MDR por sus siglas en inglés; en  $\mu\text{m}$ ) de acuerdo a las ecuaciones 1.2, 1.3 y 1.4, respectivamente. Luego se calcularon los cocientes MLR/MET y MET/MDR (en  $\mu\text{m}/\mu\text{m}$ ) como medida integradora de los cambios en la morfología de los túbulos, incluido el adelgazamiento epitelial. Los valores finales fueron computados como la media de cada sitio y temporada.

$$MET = 2 (A_o - A_i) / (P_o + P_i) \quad \text{(Ecuación 1.2)}$$

$$MLR = \sqrt{(A_i / \pi)} \quad \text{(Ecuación 1.3)}$$

$$MDR = \sqrt{(A_o / \pi)} \quad \text{(Ecuación 1.4)}$$

Donde:

$A_o$  es el área de sección de todo el perfil del túbulo

$P_o$  es el perímetro de un círculo con área  $A_o$

$A_i$  es el área de sección del perfil del lumen

$P_i$  es el perímetro del círculo correspondiente con área  $A_i$

## **Análisis estereológico de la composición celular e integridad del tejido digestivo**

La ocurrencia de reemplazo celular, es decir la pérdida de células digestivas, se evaluó como la densidad del volumen de las células basófilas (VvBAS) en la glándula digestiva (Bignell et al., 2012). Para ello se utilizó el programa STEPanizer1 (Tschanz et al., 2011), que permite realizar procedimientos estereológicos en imágenes digitales utilizando cuadrículas

de prueba generadas por computadora. Para ello, se utilizaron las fotografías de la glándula digestiva de los individuos teñidos con H-E tomadas para el análisis morfométrico de los túbulos digestivos (n = 10 por sitio y temporada). Para la estimación del volumen se utilizó un sistema de prueba multipropósito con puntos (sistema de prueba M36), en el que el número de puntos que “toca” una célula basófila (b) fue relacionado con el número de puntos que “tocan” una célula digestiva (d). Asimismo, simultáneamente se determinó la integridad del tejido de la glándula digestiva como la extensión del tejido conectivo intersticial en relación con el espacio ocupado por los túbulos digestivos, a partir del parámetro CTD. De acuerdo con el principio de Delesse (Weibel, 1979), la fracción de volumen VvBAS se calculó según la ecuación 1.5 y la relación CTD de acuerdo a la ecuación 1.6. Los valores finales fueron computados como la media de cada sitio de estudio y temporada. Para un mayor detalle de ambos procedimientos, ver el Anexo.

$$VvBAS = b / (d + b) \quad \text{(Ecuación 1.5)}$$

$$CTD = c / (b + d + l) \quad \text{(Ecuación 1.6)}$$

Donde:

b es el número de “toques” de células basófilas

d es el número de “toques” de células digestivas

l es el número de “toques” en el lumen o luz del túbulo

c es el número de “toques” en el espacio de tejido conectivo

### **Análisis histopatológico en glándula digestiva y tejido gonadal**

Los cortes histológicos teñidos con H-E se observaron al microscopio óptico (AXIOPLAN 2 Zeiss ®) y se seleccionaron al azar aproximadamente 10 campos donde se analizó la presencia de alteraciones en la glándula digestiva y el tejido gonadal de cada individuo (n = 10 por sitio y temporada).

Se calculó la prevalencia (P) de cada alteración como la relación entre el número de individuos afectados y el número de individuos analizados por 100 (Kim et al., 2006) y la prevalencia media como el promedio de las P de todos los sitios y temporadas. Se calculó la

P acumulada como la sumatoria de todas las alteraciones histopatológicas para cada sitio y temporada. Se analizó la frecuencia de aparición o intensidad de cada alteración a partir de una escala semicuantitativa de acuerdo a Kim y colaboradores (2006) con las siguientes modificaciones: 0 = sin alteración presente en ningún corte; 1 = alteración histopatológica leve, presente en <25 % de los cortes; 2 = alteración histopatológica moderada, presente en 25–75 % de los cortes y 3 = alteración histopatológica severa, presente en >75 % de los cortes. Además, se calculó la intensidad media (I) como el promedio de la frecuencia de aparición de cada alteración.

### **Parasitosis**

En los mismos cortes utilizados anteriormente se analizó la presencia de parásitos. Se calculó la prevalencia de infección (P) de cada tipo de parásito como la relación entre el número de individuos infectados y el número de individuos analizados por 100. La intensidad de infección (I) se calculó como la relación entre la frecuencia de aparición de cada tipo de parásito y el número de hospedadores infectados por ese parásito (Bush et al., 1997) utilizando la escala semicuantitativa descripta anteriormente.

### **Índice histopatológico en glándula digestiva y tejido gonadal**

Se calculó un índice cuantitativo de condición histopatológica individual (IHh) según el significado biológico de cada alteración (peso) y su frecuencia de aparición (intensidad) (Costa et al., 2011, 2013; Cuevas et al., 2015). El peso indica la relevancia de la lesión, que depende de la importancia de su patología y puede tomar los siguientes valores: 1 = importancia mínima, la lesión es reversible; 2 = importancia moderada, la lesión podría ser reversible ante la desaparición del estresor; 3 = importancia severa, la lesión es irreversible y puede provocar la pérdida parcial o total de la función del órgano. Los pesos asignados a cada alteración histopatológica en glándula digestiva y tejido gonadal se detallan en las Tablas I.8 y I.9, respectivamente. La intensidad fue asignada en base a la frecuencia de aparición de cada alteración a partir de la escala semicuantitativa descripta para el análisis histopatológico.

**Tabla I.8:** Alteraciones histopatológicas evaluadas en la glándula digestiva de *Brachidontes rodriguezii* con su respectivo peso.

| Alteración                                         | Peso |
|----------------------------------------------------|------|
| Infiltración hemocítica                            | 1    |
| Aumento del espacio intertubular                   | 1    |
| Células pigmentadas en tejido conectivo            | 1    |
| Agregados simil-lipofuscinas en células digestivas | 1    |
| Hipervacuolización de células digestivas           | 2    |
| Hiperplasia de células basófilas                   | 2    |
| Granulocitoma                                      | 2    |
| Fibrosis                                           | 2    |
| Atrofia del epitelio                               | 2    |
| Necrosis                                           | 3    |

**Tabla I.9:** Alteraciones histopatológicas evaluadas en el tejido gonadal de *Brachidontes rodriguezii* con su respectivo peso. En los individuos machos, la atresia oocitaria no fue computada.

| Alteración                                 | Peso |
|--------------------------------------------|------|
| Infiltración hemocítica                    | 1    |
| Células pigmentadas en acinos              | 1    |
| Agregados simil-lipofuscinas en los acinos | 1    |
| Granulocitoma                              | 2    |
| Fibrosis                                   | 2    |
| Atresia oocitaria                          | 3    |
| Necrosis                                   | 3    |

El IHh se calculó de acuerdo a la ecuación I.7 (Costa et al., 2011).

$$IHh = \sum_1^j p_j \times ijh \quad (\text{Ecuación I.7})$$

Donde:

IHh es el índice histopatológico para el individuo h

$p_j$  es el peso asignado a la enésima alteración j

$ijh$  es la intensidad asignada al individuo h para la enésima alteración j

Se calculó además el Ihh incluyendo la parasitosis. Finalmente, se calculó el IH con y sin parasitosis como la media de los distintos Ihh para cada sitio y temporada. Para una descripción más detallada del protocolo, ver el Anexo.

## 2.1.4 Respuestas fisiológicas

### Desarrollo gametogénico e índice gonadal

Se calculó la frecuencia de sexos y se estudiaron los estadios de desarrollo gametogénico en machos y hembras de los ejemplares del Grupo 4 (n = 10 por sitio y temporada). Se establecieron cinco estadios de desarrollo gametogénico, en base a lo descrito por Seed (1969) y Torroglosa y Giménez (2016, 2019) sobre el desarrollo gonadal de *B. rodriguezii*, con algunas modificaciones:

Reposo: inactivo o indiferenciado.

Desarrollo: comienza la gametogénesis, se observan algunas gametas maduras.

Maduro: acinos repletos de gametas maduras.

Puesta: emisión activa de gametas, en algunos acinos se observa el lumen.

Post-puesta: acinos vacíos, se observan algunas gametas residuales.

Se calculó, además, el índice gonadal (IG) de cada ejemplar dependiendo de su estadio de desarrollo gametogénico de acuerdo a Kim y colaboradores (2006) con las siguientes modificaciones: 1 = reposo; 2 = desarrollo; 3 = maduro; 4 = puesta; 2 = post-puesta (ver Anexo).

### Índice de condición

Con el fin de determinar el estado de salud general se calculó el índice de condición (IC) de los individuos de *B. rodriguezii* de cada sitio y temporada a partir de los mejillines del Grupo 3. Para ello, 20 individuos fueron pesados utilizando una balanza de electrónica portátil (SF-700 Digital Scale) antes y después de que las valvas y el biso fueran separados de la masa visceral (ver Anexo). El IC individual se calculó de acuerdo a Damiens y colaboradores (2007) a partir de la ecuación 1.8, luego se calculó la media para cada sitio y temporada.

$$IC = [(Pmv)/(Pt)] \times 100 \quad (\text{Ecuación 1.8})$$

Donde:

IC es el índice de condición del individuo

Pmv es el peso de la masa visceral (en g)

Pt es el peso total (valva, masa visceral y líquido paleal, en g)

### **Supervivencia al aire**

El ensayo de supervivencia al aire fue realizado de acuerdo a Viarengo y colaboradores (1995). En resumen, se seleccionaron 20 individuos (de cada sitio y por cada temporada) y se los expuso al aire sobre bandejas con una base de papel húmedo en una habitación con temperatura y fotoperiodo controlado de acuerdo a la temporada correspondiente. Se corroboró que todos los individuos estuvieran vivos al principio del procedimiento y se los examinó diariamente (aproximadamente a la misma hora) para registrar el número de individuos muertos, hasta alcanzar el 100 % de mortalidad. Un individuo era considerado muerto cuando no respondía cerrando las valvas ante estímulos físicos. Al alcanzar el 100 % de mortalidad, se calcularon las curvas de supervivencia y el parámetro de tiempo de letalidad  $TL_{50}$  que determina el tiempo al cual el 50 % de los individuos ha muerto (ver Anexo).

## **2.1.5 Integración de las distintas respuestas biológicas**

Se calculó, para cada sitio y temporada, el índice integral de respuestas biológicas (IBR) a partir de las siguientes respuestas biológicas:

- Biomarcadores bioquímicos: actividad de SOD, CAT, GST.
- Biomarcadores celulares: acumulación de LN y LF.
- Biomarcadores tisulares: relación MLR/MET, VvBAS, CTD, IH glándula digestiva, IH tejido gonadal.
- Respuestas fisiológicas: IC,  $TL_{50}$ .

Se calculó el IBR para cada sitio y temporada de acuerdo a lo descrito por Beliaeff y Burgeot (2002) a partir de los siguientes pasos:

1. Cálculo de la media ( $\bar{m}_i$ ) y desvío estándar ( $SD_i$ ) del conjunto de datos por respuesta biológica.
2. Cálculo de la media ( $\bar{X}_i$ ) para cada muestra por respuesta biológica.

3. Estandarización de datos para cada muestra,  $Y_i$  = valor estandarizado por respuesta biológica:  $Y_i = (X_i - m_i)/SD_i$ . Donde:  $X_i$  = valor medio de la respuesta de cada muestra;  $m_i$  = valor de la media general de todas las muestras comparadas (conjunto de datos);  $SD_i$  = desvío estándar de todas las muestras.
4. Análisis del efecto esperado de la respuesta biológica, si el valor de la respuesta disminuye a mayor estrés ambiental, se usa la inversa del valor. Entonces:  $Z_i = -Y_i$ ;  $Z_i = Y_i$ .
5. Suma del valor estandarizado obtenido para cada muestra al valor absoluto estandarizado mínimo del conjunto de datos:  $S_i = Z_i + |x_{min}'|$ . Donde:  $x_{min}' = (min - m_i)/SD_i$ .
6. Cálculo de las áreas radiales multiplicando el valor estandarizado de cada respuesta biológica ( $Y_i$ ) por el siguiente valor de respuesta ( $Y_i + 1$ ) y dividiendo cada cálculo por 2.  $A_i = (Y_i \times (Y_i + 1)) / 2$ .

Finalmente, se calculó el índice IBR a partir de la ecuación I.9 (Beliaeff y Burgeot, 2002).

$$IBR = \sum A_i \quad (\text{Ecuación I.9})$$

Dado que el valor de IBR depende de la cantidad de respuestas biológicas analizadas en el conjunto de datos, se dividió el valor de IBR obtenido por el número de respuestas utilizadas ( $n = 12$ ) para calcular  $IBR/n$  (Brooks et al., 2011; Marigómez et al., 2013a).

## 2.1.6 Análisis estadísticos

Para todos los análisis se estableció un nivel de significancia del 95 % ( $p < 0,05$ ) y se utilizó el programa STATISTICA 13 (StatSoft, Inc.). Los parámetros SOD, CAT, GST, VvLN, VvLF, VvBSD, MLR/MET, MET/MLR, VvBAS, CTD, IH e IC fueron analizados mediante un análisis de la varianza de 2 factores (ANOVA dos factores) con el fin de determinar el efecto del sitio, temporada y su interacción (sitio x temporada). Luego, se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para determinar las diferencias entre sitios y entre temporadas. Previo a cada análisis, se verificó el cumplimiento de los supuestos: la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homoscedasticidad mediante la prueba

de Levene. En algunos casos, al no cumplirse alguno de estos supuestos, fue necesario aplicar una transformación (logarítmica) al conjunto de datos (*i.e.* SOD, CAT, GST, MLR/MET, CTD). En aquellos casos en que luego de transformar los datos los supuestos seguían sin cumplirse (VvLN, VvLF, IH del tejido gonadal, IC), se aplicó la prueba equivalente no paramétrica (Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples por pares de mediana).

La frecuencia de sexos fue analizada mediante la prueba estadística Binomial para determinar si las frecuencias observadas de machos y hembras en cada sitio y temporada eran distintas a las frecuencias esperadas para la especie (1:1).

Las curvas de supervivencia fueron comparadas utilizando la prueba de Log-Rank para analizar si había diferencias estadísticas entre los sitios y temporadas de estudio.

## 2.2 RESULTADOS

### 2.2.1 Respuesta de biomarcadores bioquímicos

#### **Actividad enzimática de SOD**

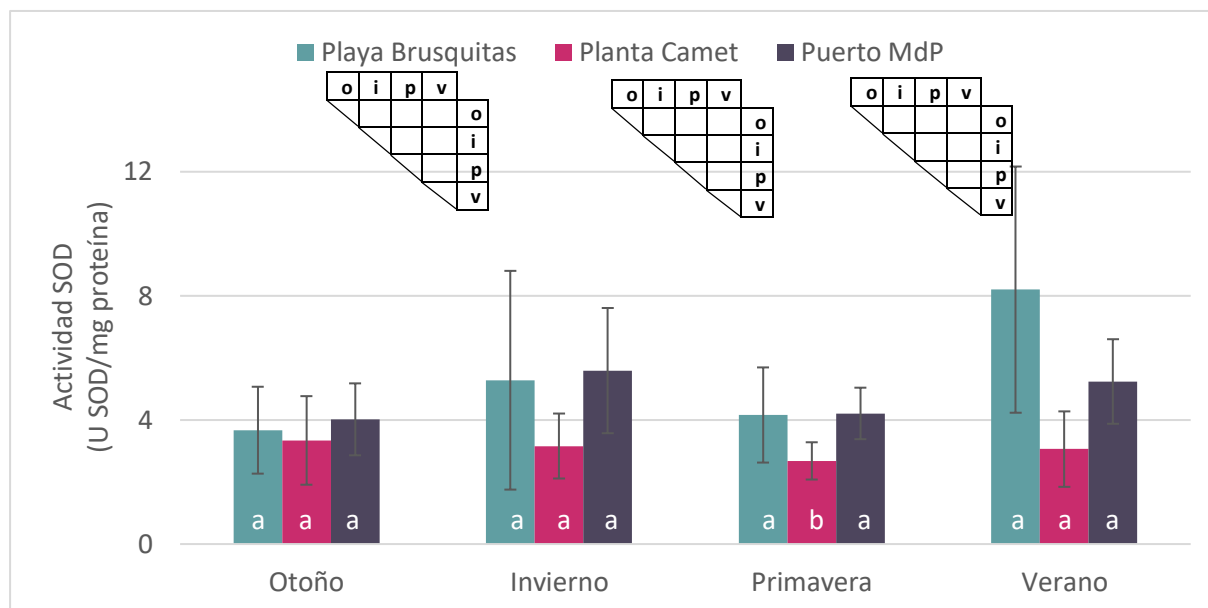
La actividad de SOD en PB varió entre  $3,67 \pm 1,40$  y  $8,20 \pm 3,97$  (media  $\pm$  de, U SOD/ mg proteína), en PC entre  $2,68 \pm 1,05$  y  $3,34 \pm 1,43$  (media  $\pm$  de, U SOD/ mg proteína), y en PMdP entre  $4,02 \pm 1,16$  y  $5,59 \pm 2,02$  (media  $\pm$  DE, U SOD/ mg proteína) (Figura I.10). De acuerdo al ANOVA de dos factores se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de SOD entre los sitios, pero no entre las temporadas ni en la interacción sitio x temporada (Tabla I.10).

**Tabla I.10.** Resumen del ANOVA dos factores para analizar el efecto de sitio, temporada y su interacción sobre los distintos parámetros estudiados en *Brachidontes rodriguezii* recolectados en PB, PC y PMdP durante otoño, invierno primavera y verano. Los asteriscos representan diferencias significativas: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ .

| Parámetro       | Sitio |       |          | Temporada |       |          | Interacción |      |         |
|-----------------|-------|-------|----------|-----------|-------|----------|-------------|------|---------|
|                 | g.l   | F     | p        | g.l       | F     | p        | g.l         | F    | p       |
| <b>SOD</b>      | 2     | 11,03 | < 0,001* | 3         | 2,28  | 0,09     | 6           | 1,29 | 0,27    |
| <b>CAT</b>      | 2     | 1,51  | 0,23     | 3         | 27,44 | < 0,001* | 6           | 1,69 | 0,14    |
| <b>GST</b>      | 2     | 9,57  | < 0,001* | 3         | 18,26 | < 0,001* | 6           | 0,42 | 0,86    |
| <b>MLR/MET</b>  | 2     | 11,79 | < 0,001* | 3         | 5,21  | 0,002*   | 6           | 0,98 | 0,44    |
| <b>MET/MDR</b>  | 2     | 12,10 | < 0,001* | 3         | 3,60  | 0,02*    | 6           | 0,82 | 0,56    |
| <b>VvBAS</b>    | 2     | 20,72 | < 0,001* | 3         | 1,26  | 0,29     | 6           | 4,08 | 0,001** |
| <b>CTD</b>      | 2     | 9,78  | < 0,001* | 3         | 6,54  | < 0,001* | 6           | 2,08 | 0,06    |
| <b>IHgd c/p</b> | 2     | 4,26  | 0,016*   | 3         | 1,72  | 0,17     | 6           | 1,79 | 1,07    |
| <b>IHgd s/p</b> | 2     | 5,37  | 0,006*   | 3         | 1,84  | 0,14     | 6           | 2,18 | 0,04    |
| <b>IHg c/p</b>  | 2     | 0,80  | 0,45     | 3         | 1,10  | 0,35     | 6           | 0,69 | 0,66    |
| <b>IHg s/p</b>  | 2     | 2,55  | 0,08     | 3         | 1,73  | 0,16     | 6           | 0,81 | 0,57    |

g.l: grados de libertad; F: proporción de Fisher; p: probabilidad de F; SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; GST: glutatión-S-transferasa; MLR/MET: radio medio del lumen/altura media del epitelio; MET/MDR: altura media del epitelio/radio medio del túbulo; VvBAS: densidad del volumen de las células basófilas; CTD: espacio ocupado por el tejido conectivo; IHgd c/p: índice histopatológico de la glándula digestiva con parasitosis; IHgd s/p: índice histopatológico de la glándula digestiva sin parasitosis; IHg c/p: índice histopatológico del tejido gonadal con parasitosis; IHg s/p: índice histopatológico del tejido gonadal sin parasitosis.

En primavera la actividad de SOD fue significativamente mayor en PB y PMdP con respecto a PC; mientras que en verano la actividad observada en PB fue significativamente mayor que la de PC sin ninguno presentar diferencias con PMdP (Figura I.10; comparaciones múltiples de Tukey;  $p < 0,05$ ). En otoño e invierno no se observaron diferencias significativas (Figura I.10, comparaciones múltiples de Tukey;  $p > 0,05$ ).

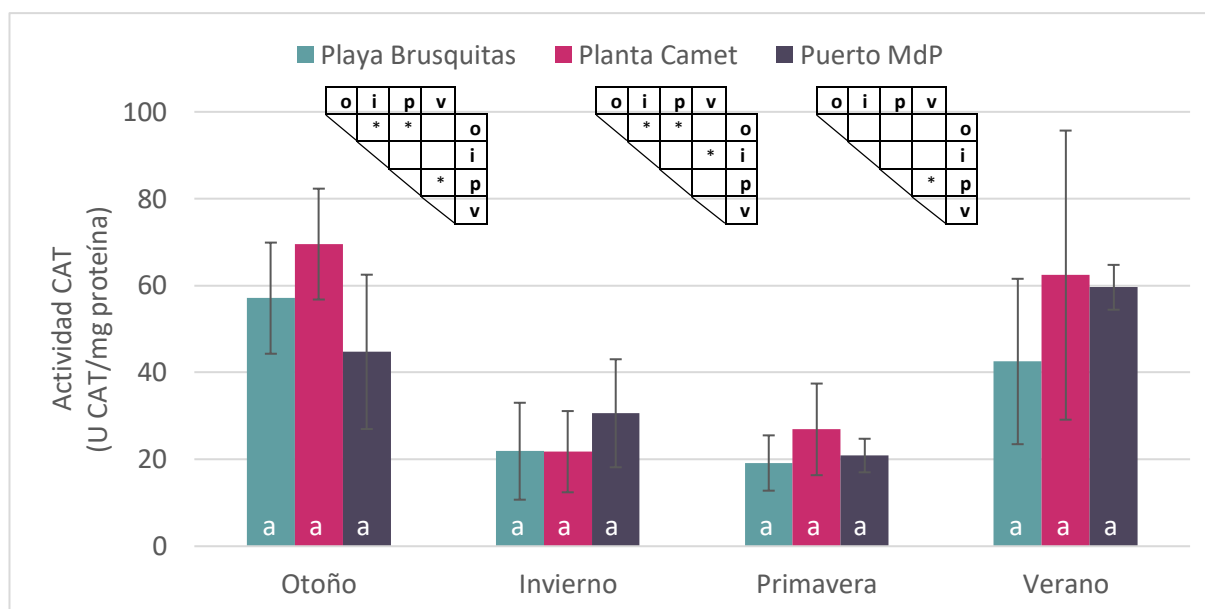


**Figura I.10.** Actividad enzimática de SOD (U SOD/mg proteína) en masa visceral de *Brachidontes rodriguezii* de los distintos sitios de estudio y temporadas (media  $\pm$  DE). Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios para cada temporada ( $p < 0,05$ ). Las matrices triangulares con asteriscos representan diferencias significativas entre las temporadas para cada sitio ( $p < 0,05$ ). o: Otoño; i: Invierno; p: Primavera; v: Verano.

### Actividad enzimática de CAT

La actividad de CAT en PB varió entre  $19,16 \pm 6,37$  y  $57,11 \pm 12,79$  (media  $\pm$  DE, U CAT/ mg proteína), en PC entre  $21,77 \pm 9,35$  y  $69,56 \pm 12,76$  (media  $\pm$  DE, U CAT/ mg proteína), y en PMdP entre  $20,88 \pm 3,86$  y  $59,61 \pm 5,16$  (media  $\pm$  DE, U CAT/ mg proteína) (Figura I.11). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de CAT a lo largo de las temporadas, pero no entre los sitios ni en su interacción (Tabla I.10). En los tres sitios la actividad de CAT aumentó en otoño, disminuyó en invierno y primavera para luego volver a aumentar en verano. En PB los valores de otoño fueron significativamente mayores que los observados en invierno y primavera, y estos últimos significativamente menores que los observados en verano (Figura I.11; comparaciones múltiples de Tukey;  $p < 0,05$ ). La misma tendencia fue observada en PC, salvo que los valores observados en verano fueron significativamente mayores que los de invierno (Figura I.11; comparaciones múltiples de Tukey;  $p < 0,05$ ). En los ejemplares recolectados en PMdP la actividad de CAT fue menor

en invierno y primavera con respecto al verano, y en primavera fue significativamente menor que en otoño (Figura I.11; comparaciones múltiples de Tukey;  $p < 0,05$ ).

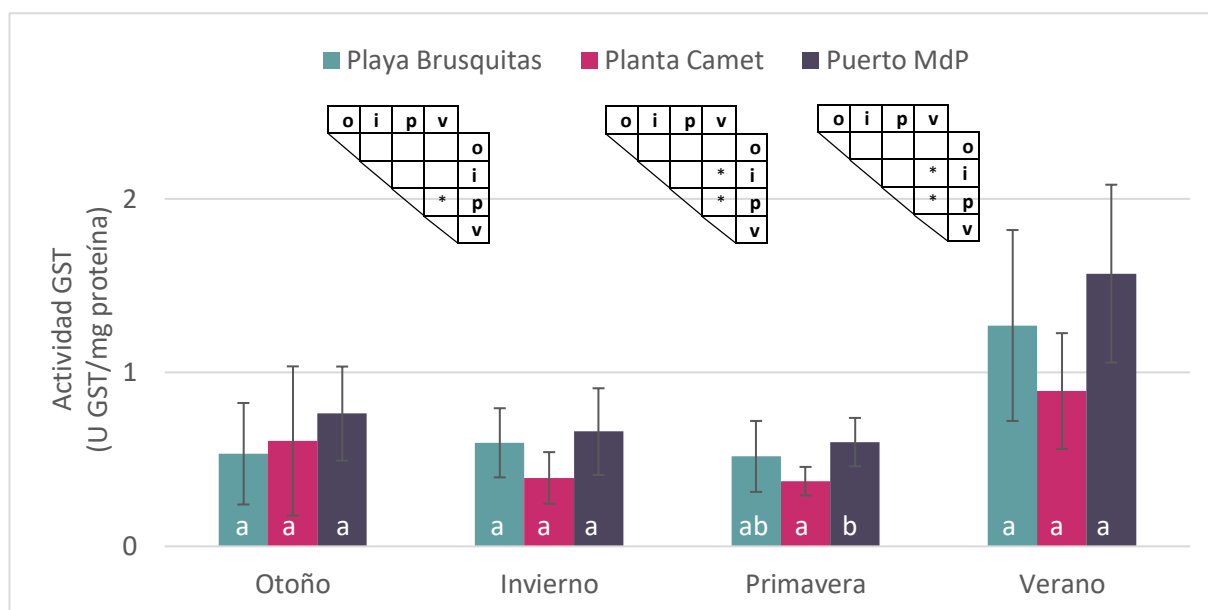


**Figura I.11.** Actividad enzimática de CAT (U CAT/mg proteína) en masa visceral de *Brachidontes rodriguezii* de los distintos sitios de estudio y temporadas (media  $\pm$  DE). Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios para cada temporada ( $p < 0,01$ ). Las matrices triangulares con asteriscos representan diferencias significativas entre las temporadas para cada sitio ( $p < 0,05$ ). o: Otoño; i: Invierno; p: Primavera; v: Verano.

### Actividad enzimática de GST

La actividad de GST en PB varió entre  $0,52 \pm 0,20$  y  $1,27 \pm 0,55$  (media  $\pm$  DE, U GST/ mg proteína), en PC entre  $0,38 \pm 0,08$  y  $0,89 \pm 0,33$  (media  $\pm$  DE, U GST/ mg proteína), y en PMdP entre  $0,60 \pm 0,14$  y  $1,57 \pm 0,51$  (media  $\pm$  DE, U GST/ mg proteína) (Figura I.12). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de GST entre los sitios y las temporadas, pero no en su interacción (Tabla I.10). Durante la primavera la actividad observada en PMdP fue significativamente mayor que la observada en PC (Figura I.12; comparaciones múltiples de Tukey;  $p < 0,05$ ). No se observaron diferencias entre los sitios para el resto de las temporadas. En todos los sitios se observó un aumento de actividad enzimática de GST en verano respecto al resto de las temporadas, excepto para PC donde

solo se observaron diferencias respecto al invierno y primavera (Figura I.12; comparaciones múltiples de Tukey;  $p < 0,05$ ).



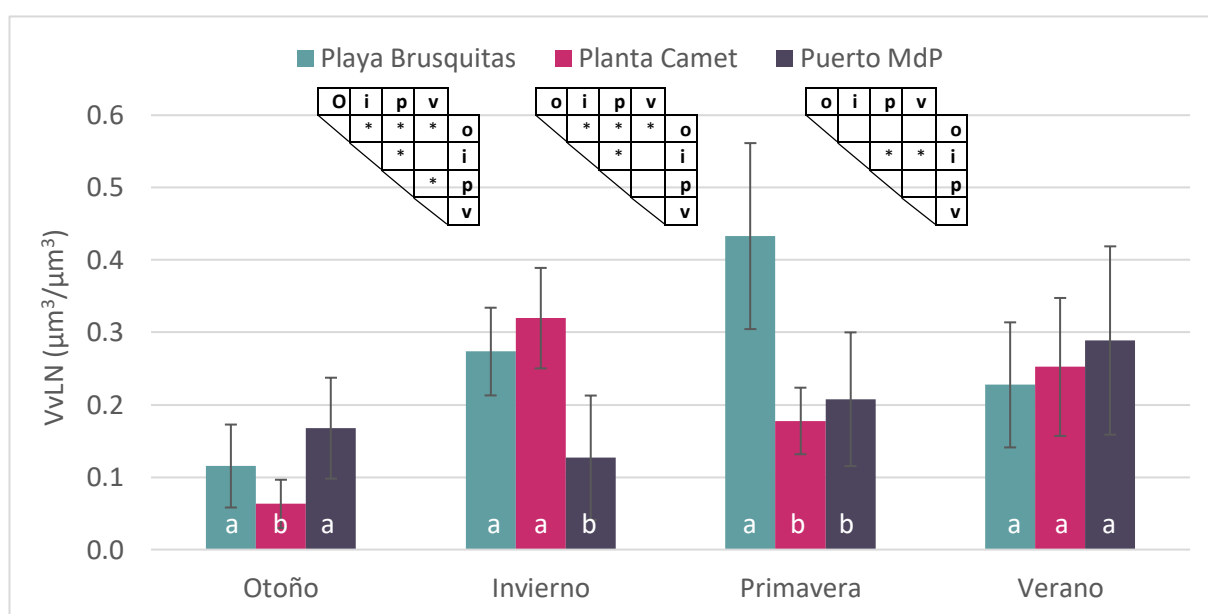
**Figura I.12.** Actividad enzimática de GST (U GST/mg proteína) en masa visceral de *Brachidontes rodriguezii* de los distintos sitios de estudio y temporadas (media  $\pm$  DE). Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios para cada temporada ( $p < 0,05$ ). Las matrices triangulares con asteriscos representan diferencias significativas entre las temporadas para cada sitio ( $p < 0,05$ ). o: Otoño; i: Invierno; p: Primavera; v: Verano.

## 2.2.2 Respuestas de biomarcadores celulares en glándula digestiva

### Acumulación intracelular de lípidos neutros y lipofuscinas

La acumulación intracelular de LN en la glándula digestiva de *B. rodriguezii* varió entre  $0,12 \pm 0,06$  y  $0,43 \pm 0,13 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$  (media  $\pm$  DE) en los ejemplares de PB, entre  $0,06 \pm 0,03$  y  $0,32 \pm 0,07 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$  (media  $\pm$  DE) en los ejemplares de PC y entre  $0,13 \pm 0,09$  y  $0,29 \pm 0,13 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$  (media  $\pm$  DE) en los ejemplares de PMdP. En otoño, la acumulación de LN fue significativamente menor en los ejemplares recolectados en PC respecto a PB y PMdP (Figura I.13; prueba de Kruskal-Wallis (K-W),  $H = 22,37$ ;  $p < 0,05$ ). En la temporada siguiente (invierno) los valores observados en PB y PC aumentaron notoriamente, siendo la acumulación de LN significativamente mayor que la de los ejemplares recolectados en PMdP

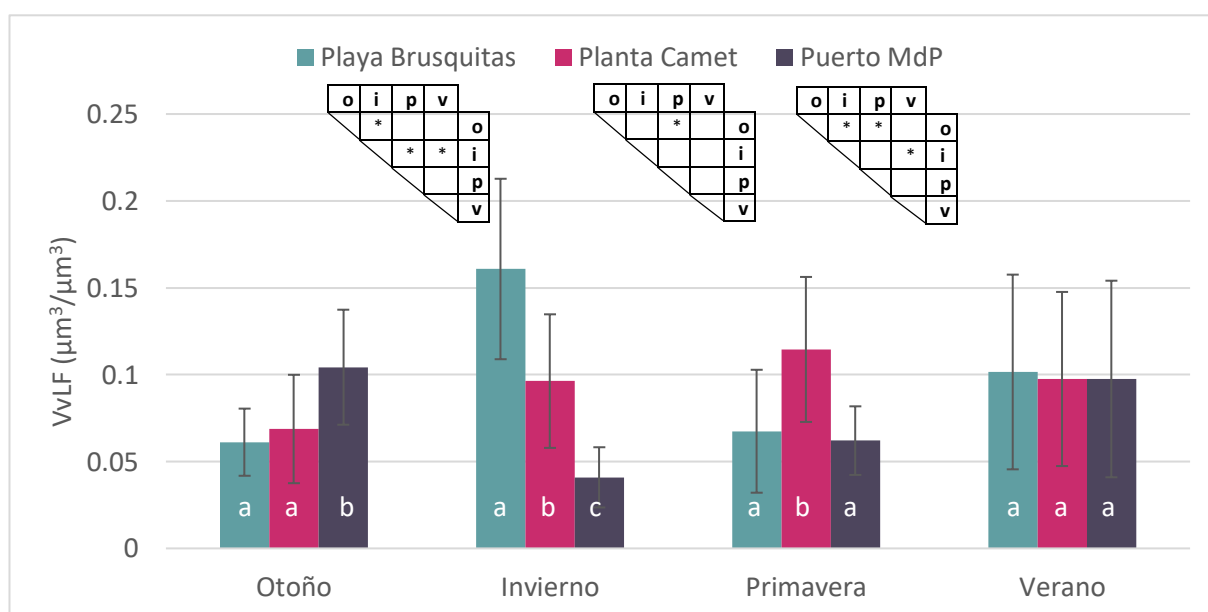
(Figura I.13; K-W,  $H = 39,41$ ;  $p < 0,05$ ). En primavera, la acumulación de LN fue significativamente mayor en los ejemplares recolectados en PB (Figura I.13; K-W,  $H = 37,09$ ;  $p < 0,05$ ). No se observaron diferencias durante el verano (Figura I.13; K-W,  $H = 2,19$ ;  $p > 0,05$ ). En lo que respecta a la comparación entre temporadas en PB y PC, los valores significativamente más bajos fueron observados durante el otoño, mientras que los mayores fueron observados durante la primavera en PB (Figura I.13; K-W,  $H = 49,13$ ;  $p < 0,05$ ) y durante el invierno en PC (Figura 13; K-W,  $H = 60,76$ ;  $p < 0,05$ ). En los ejemplares recolectados en PMdP, los valores significativamente más bajos fueron observados durante el invierno (Figura I.13; K-W,  $H = 20,90$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura I.13.** Acumulación intracelular de lípidos neutros en densidad de volumen ( $VvLN \mu m^3/\mu m^3$ ) en la glándula digestiva de *Brachidontes rodriguezii* de los distintos sitios de estudio y temporadas (media  $\pm$  DE). Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios para cada temporada ( $p < 0,05$ ). Las matrices triangulares con asteriscos representan diferencias significativas entre las temporadas para cada sitio ( $p < 0,05$ ). o: Otoño; i: Invierno; p: Primavera; v: Verano.

La acumulación intracelular de LF en los ejemplares de *B. rodriguezii* varió entre  $0,06 \pm 0,02$  y  $0,16 \pm 0,05 \mu m^3/\mu m^3$  (media  $\pm$  DE) en los ejemplares recolectados en PB, entre  $0,07 \pm 0,03$  y  $0,11 \pm 0,04 \mu m^3/\mu m^3$  (media  $\pm$  DE) en los ejemplares de PC y entre  $0,04 \pm 0,02$  y  $0,10 \pm 0,03 \mu m^3/\mu m^3$  (media  $\pm$  DE) en los ejemplares recolectados en PMdP. Durante el otoño, la acumulación de LF fue significativamente mayor en los ejemplares recolectados en PMdP

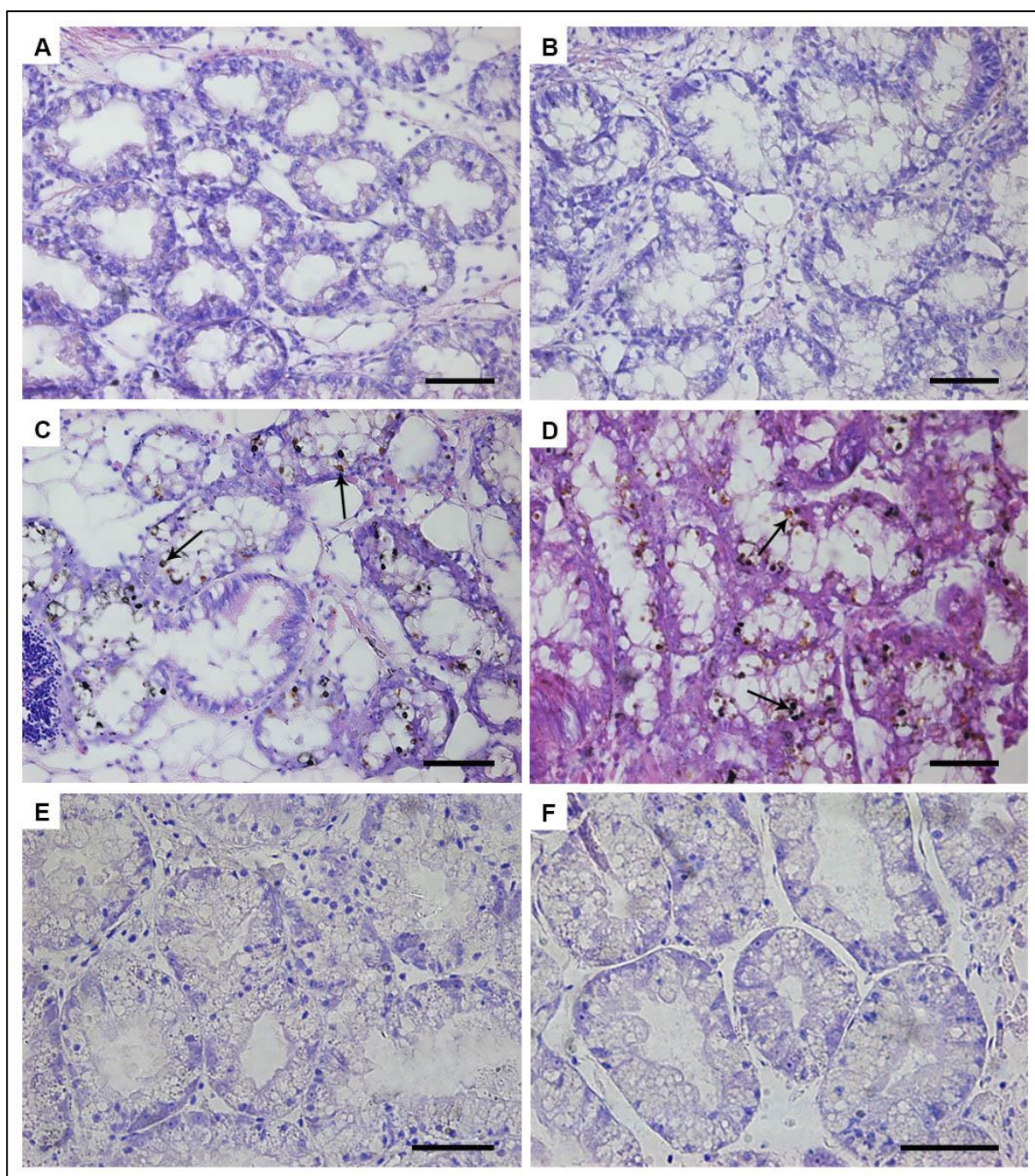
(Figura I.14; K-W,  $H = 13,92$ ;  $p < 0,05$ ), mientras que en invierno fue menor comparado con los otros dos sitios (Figura I.14; K-W,  $H = 40,93$ ;  $p < 0,05$ ). Durante esta temporada, los ejemplares de PB fueron los que presentaron los valores más elevados. En primavera, los individuos de PC presentaron los valores significativamente más altos (Figura I.14; K-W,  $H = 19,50$ ;  $p < 0,05$ ). No se observaron diferencias entre los sitios durante el verano (Figura I.14; K-W,  $H = 0,34$ ;  $p > 0,05$ ). En los ejemplares recolectados en PB la acumulación de LF fue significativamente mayor en invierno (Figura I.14; K-W,  $H = 32,22$ ;  $p < 0,05$ ). En PC los valores más altos se observaron durante la primavera, aunque solo se encontraron diferencias significativas respecto al otoño (Figura I.14; K-W,  $H = 14,40$ ;  $p < 0,05$ ). En los ejemplares recolectados en el PMdP la mayor acumulación de LF durante el otoño fue significativamente mayor respecto al invierno y a la primavera (Figura I.14; K-W,  $H = 34,22$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura I.14.** Acumulación intracelular de lipofuscinas en densidad de volumen ( $VvLF \mu m^3/\mu m^3$ ) en la glándula digestiva de *Brachidontes rodriguezii* de los distintos sitios de estudio y temporadas (media  $\pm$  DE). Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios para cada temporada ( $p < 0,05$ ). Las matrices triangulares con asteriscos representan diferencias significativas entre las temporadas para cada sitio ( $p < 0,05$ ). o: Otoño; i: Invierno; p: Primavera; v: Verano.

## **Análisis autometalográfico para la detección de depósitos metálicos en las células de los túbulos de la glándula digestiva**

Se realizaron distintas pruebas con el *kit silver enhancing reagent* de AURION® (R-Gent SE-LM) para comprobar la sensibilidad del *kit* para detección de depósitos metálicos. Esto se comprobó realizando el experimento con los controles positivos y negativos incluidos. Sin embargo, el *kit* no fue sensible en la detección de depósitos metálicos en las muestras de *B. rodriguezii* (Figura I.15).

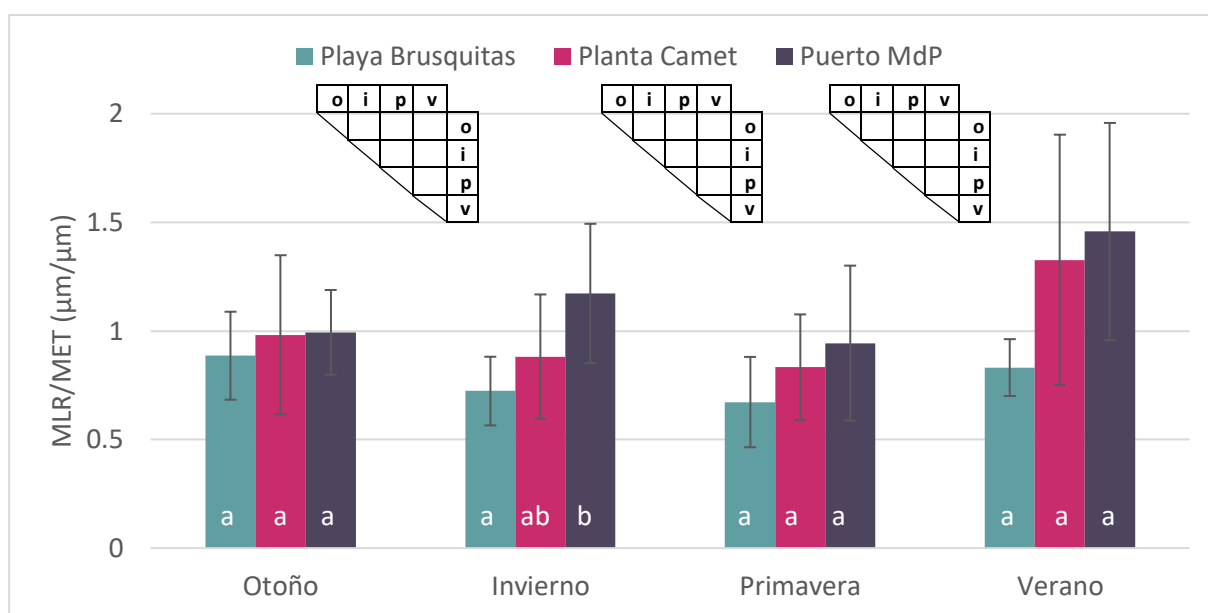


**Figura I.15.** Micrografías de secciones histológicas de la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis* (A-D) y *Brachidontes rodriguezii* (E-F) tratadas con la reacción de *silver enhancing reagent* y contracoloradas con hematoxilina-eosina. **A-B.** Individuos *Mytilus galloprovincialis* sin exposición a Ag (control negativo), **C-D.** Individuos de *Mytilus galloprovincialis* expuestos a Ag 750µg/L (control positivo). Nótese la presencia de depósitos metálicos de color marrón oscuro y negro (flechas). **E-F.** Individuos de *Brachidontes rodriguezii* donde no se observa una reacción positiva a los depósitos metálicos. Escala: 50 µm.

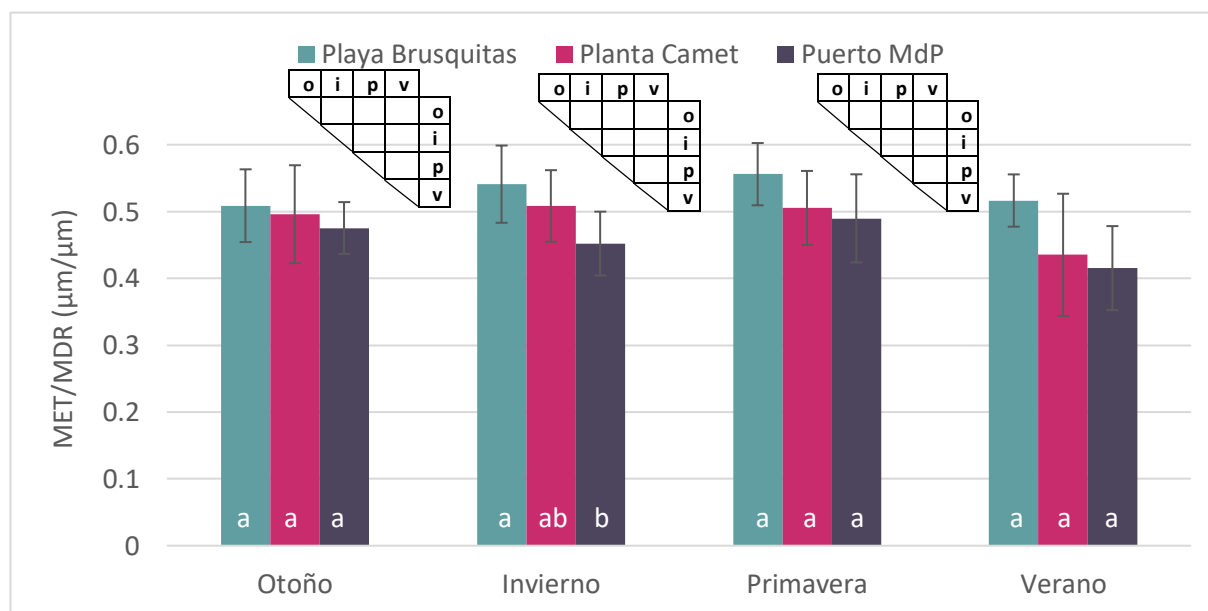
## 2.2.3 Respuestas de biomarcadores tisulares en glándula digestiva y tejido gonadal

### Análisis morfométrico de los túbulos digestivos

El intervalo de valores para el parámetro MLR/MET en los individuos de PB fue de  $0,67 \pm 0,21$  a  $0,89 \pm 0,20$  (µm/µm, media ± DE), en los ejemplares de PC fue de  $0,83 \pm 0,24$  y  $1,33 \pm 0,58$  (µm/µm, media ± DE), y en los ejemplares de PMdP fue de  $0,94 \pm 0,36$  y  $1,46 \pm 0,50$  (µm/µm, media ± DE). Para el parámetro MET/MDR varió entre  $0,51 \pm 0,05$  a  $0,56 \pm 0,05$  (µm/µm, media ± DE) para los individuos recolectados en PB, entre  $0,44 \pm 0,09$  y  $0,51 \pm 0,06$  (µm/µm, media ± DE) para los ejemplares de PC, y entre  $0,42 \pm 0,06$  y  $0,49 \pm 0,07$  (µm/µm, media ± DE) para los ejemplares recolectados en PMdP. Se observaron diferencias estadísticamente significativas para ambos biomarcadores (MLR/MET y MET/MDR) entre los sitios y las temporadas, pero no en su interacción (Tabla I.10). Solo se observaron diferencias para ambos biomarcadores durante el invierno (Figuras I.16 y I.17), en donde el valor de MLR/MET en PMdP fue significativamente mayor que el de PB (Figura I.16; comparaciones múltiples de Tukey;  $p < 0,05$ ) mientras que MET/MDR fue significativamente menor (Figura I.17; comparaciones múltiples de Tukey;  $p < 0,05$ ). No se observaron diferencias significativas en ninguno de los dos biomarcadores a lo largo de las temporadas (Figuras I.16 y I.17; comparaciones múltiples de Tukey;  $p > 0,05$ ).



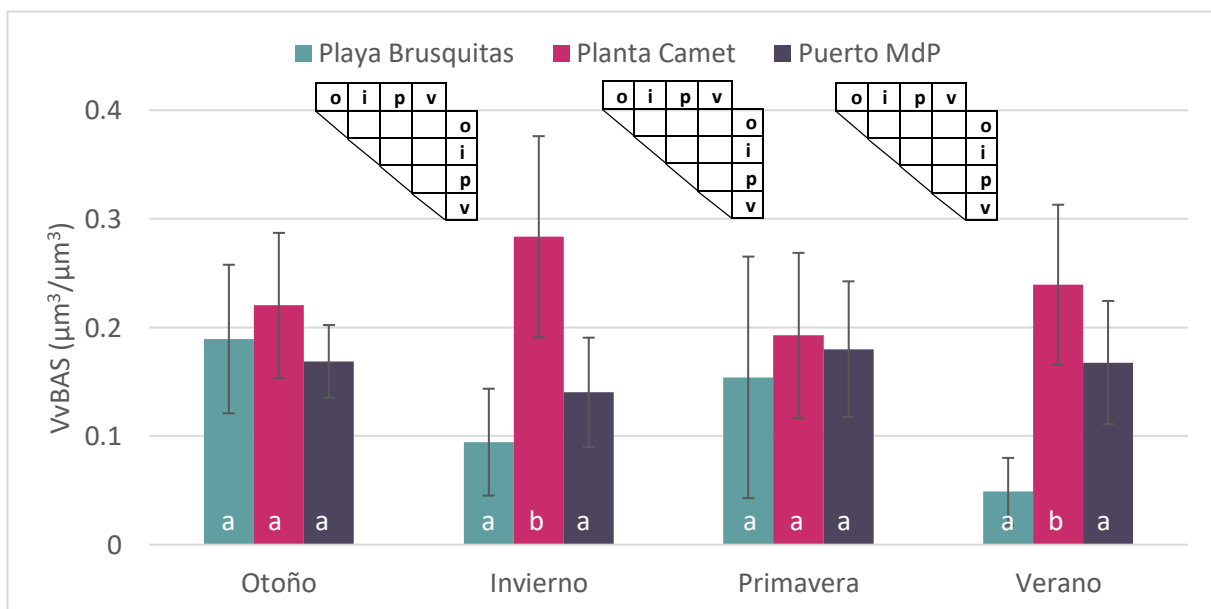
**Figura I.16.** Valores de la relación MLR/MET ( $\mu\text{m}/\mu\text{m}$ ) de los túbulos digestivos de *Brachidontes rodriguezii* de los distintos sitios de estudio y temporadas (media  $\pm$  DE). Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios para cada temporada ( $p < 0,05$ ). Las matrices triangulares con asteriscos representan diferencias significativas entre temporadas de cada sitio ( $p < 0,05$  en Playa Brusquitas y Playa Camet) ( $p < 0,01$  en Puerto MdP). o: Otoño; i: Invierno; p: Primavera; v: Verano.



**Figura I.17.** Valores de la relación MET/MDR ( $\mu\text{m}/\mu\text{m}$ ) de los túbulos digestivos de *Brachidontes rodriguezii* de los distintos sitios de estudio y temporadas (media  $\pm$  DE). Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios para cada temporada ( $p < 0,05$ ). Las matrices triangulares con asteriscos representan diferencias significativas entre las temporadas de cada sitio ( $p < 0,05$ ). o: Otoño; i: Invierno; p: Primavera; v: Verano.

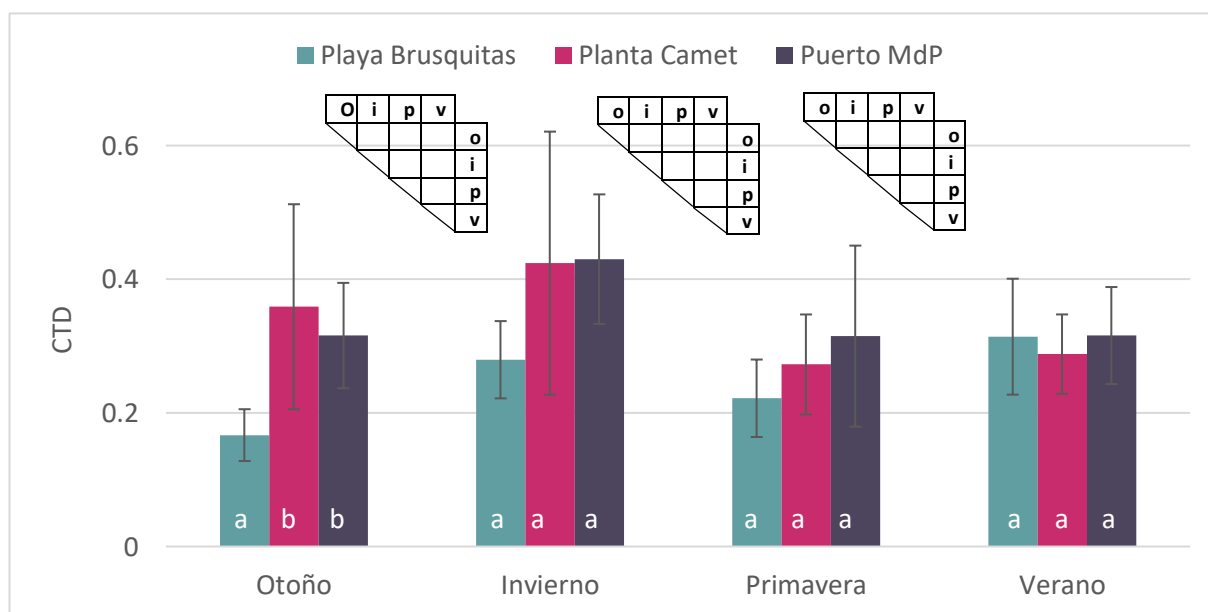
## Análisis estereológico de la composición celular e integridad del tejido digestivo

Para el parámetro VvBAS el intervalo de valores de los individuos recolectados en PB se halló entre  $0,05 \pm 0,03$  y  $0,19 \pm 0,07$  ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$ , media  $\pm$  DE), el de los ejemplares de PC entre  $0,19 \pm 0,08$  y  $0,28 \pm 0,09$  ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$ , media  $\pm$  DE), y el de los ejemplares recolectados en PMdP se encontró entre  $0,14 \pm 0,05$  y  $0,18 \pm 0,06$  ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$ , media  $\pm$  DE). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los sitios y las temporadas, pero no en su interacción (Tabla I.10). En invierno, el valor de VvBAS fue significativamente mayor en los ejemplares recolectados en PC que el de los ejemplares de PB y PMdP (Figura I.18; comparaciones múltiples de Tukey;  $p < 0,05$ ). En verano, los valores de PC y PMdP fueron significativamente mayores que en PB (Figura I.18; comparaciones múltiples de Tukey;  $p < 0,05$ ). No se observaron diferencias significativas entre las temporadas para cada sitio (Figura I.18; comparaciones múltiples de Tukey;  $p > 0,001$ ).



**Figura I.18.** Valores del volumen en densidad de células basófilas VvBAS ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$ ) de los túbulos digestivos de ejemplares de *Brachidontes rodriguezii* en los distintos sitios de estudio y temporadas (media  $\pm$  DE). Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios en cada temporada ( $p < 0,05$ ). Las matrices triangulares con asteriscos representan diferencias significativas entre las temporadas de cada sitio ( $p < 0,05$ ). o: Otoño; i: Invierno; p: Primavera; v: Verano.

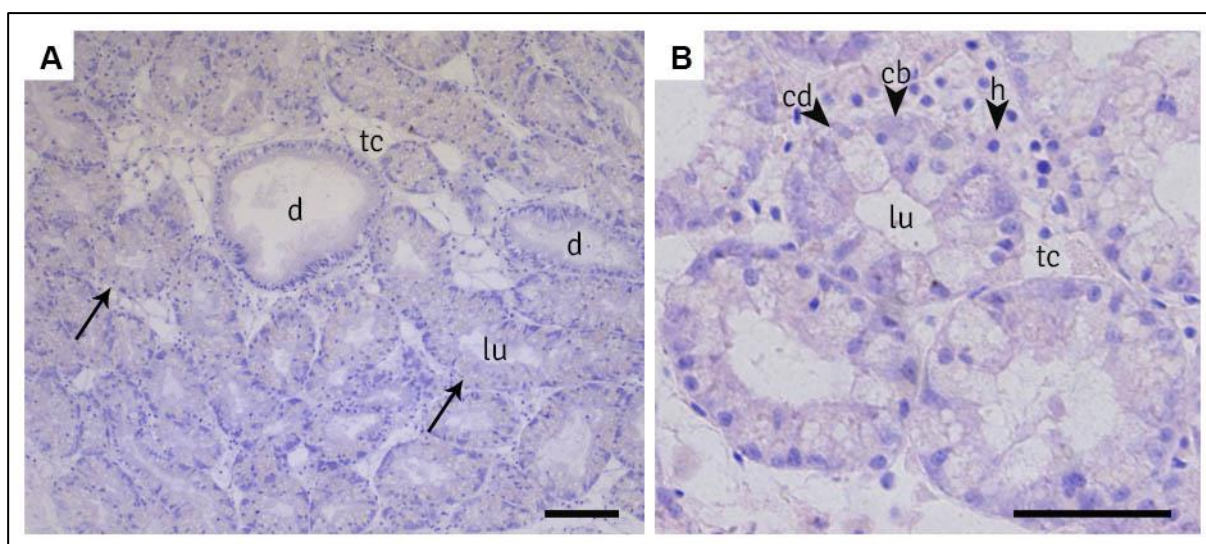
El intervalo de valores de la relación CTD de los individuos recolectados en PB se halló entre  $0,17 \pm 0,04$  y  $0,31 \pm 0,09$  (media  $\pm$  DE), el de los ejemplares de PC entre  $0,27 \pm 0,07$  y  $0,42 \pm 0,20$  (media  $\pm$  DE), y el de los ejemplares recolectados en PMdP se encontró entre  $0,31 \pm 0,14$  y  $0,43 \pm 0,10$  (media  $\pm$  DE). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los sitios y las temporadas, pero no es su interacción (Tabla I.10). En otoño, tanto los valores de CTD de los ejemplares de PC y PMdP fueron significativamente mayores que en PB (Figura I.19; comparaciones múltiples de Tukey;  $p < 0,05$ ). En invierno, el valor de CTD fue mayor en los ejemplares recolectados en PMdP que en PB (Figura I.19; comparaciones múltiples de Tukey;  $p < 0,05$ ) y ambos sitios no presentaron diferencias con PC ( $p > 0,05$ ). Al analizar las diferencias entre las temporadas de cada sitio, solo se observaron diferencias significativas en PB, donde el valor de CTD disminuyó de verano a otoño y luego aumentó nuevamente en el invierno (Figura I.19; comparaciones múltiples de Tukey;  $p < 0,05$ ).



**Figura I.19.** Valores de la relación CTD (media  $\pm$  DE) de los túbulos digestivos de ejemplares de *Brachidontes rodriguezii* en los distintos sitios de estudio y temporadas. Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios en cada temporada ( $p < 0,05$ ). Las matrices triangulares con asteriscos representan diferencias significativas entre las temporadas para cada sitio ( $p < 0,05$ ). o: Otoño; i: Invierno; p: Primavera; v: Verano.

## Daños histológicos en glándula digestiva

Para la siguiente descripción histopatológica de la glándula digestiva, se consideraron los mejillines de todos los sitios de estudio y temporadas analizados. La glándula digestiva de los individuos de *B. rodriguezii* analizados presentó las características propias de la especie previamente descrita en otros trabajos (Arrighetti et al., 2019). En resumen, la glándula está compuesta por numerosos túbulos digestivos que terminan en acinos ciegos. Estos túbulos se ramifican desde un divertículo que se abre desde el estómago y en un corte transversal los túbulos de la glándula digestiva son circulares u ovalados con un lumen angosto. El epitelio de los túbulos consta de una capa simple con dos tipos celulares: las células digestivas y las células basófilas. El espacio intertubular está formado por escaso tejido conectivo por el cual circulan los hemocitos (Figura I.20).



**Figura I.20.** Micrográficas de secciones histológicas de la glándula digestiva de *Brachidontes rodriguezii*. **A.** Vista general de un corte transversal de la glándula digestiva donde se observan, entre el tejido conectivo (tc), dos divertículos (d) y numerosos túbulos digestivos (flecha) con lumen (lu) de tamaño variable. **B.** Detalle de los túbulos digestivos con células digestivas (cd) y células basófilas (cb) y hemocitos (h) en el tejido conectivo (tc). Tinción: hematoxilina-eosina. Escala: A = 100 µm, B = 50 µm.

La prevalencia (P) de las alteraciones histopatológicas observadas en la glándula digestiva de los ejemplares de los distintos sitios y temporadas, como así también la P media, se representan en la Tabla I.12. La Tabla I.13 presenta la intensidad observada para las distintas alteraciones.

**Tabla I.12.** Prevalencia (%) de las alteraciones histopatológicas registradas en la glándula digestiva de *Brachidontes rodriguezii* en los distintos sitios de estudio y temporadas, y Prevalencia media total (Pm) de cada alteración (%).

|                                  | Otoño           |    |      | Invierno |    |      | Primavera |    |      | Verano |     |      |        |
|----------------------------------|-----------------|----|------|----------|----|------|-----------|----|------|--------|-----|------|--------|
|                                  | PB              | PC | PMdP | PB       | PC | PMdP | PB        | PC | PMdP | PB     | PC  | PMdP |        |
| Alteración histopatológica       | Prevalencia (%) |    |      |          |    |      |           |    |      |        |     |      | Pm (%) |
| Infiltración hemocítica          | 64              | 67 | 63   | 50       | 69 | 67   | 67        | 89 | 50   | 67     | 20  | 40   | 59     |
| Aumento del espacio intertubular | 57              | 53 | 63   | 83       | 46 | 89   | 33        | 56 | 50   | 83     | 60  | 80   | 63     |
| Células pigmentadas en tc        | 7               | 13 | 13   | 0        | 0  | 11   | 0         | 0  | 10   | 50     | 0   | 0    | 9      |
| Agregados simil-LF               | 50              | 93 | 94   | 75       | 62 | 100  | 67        | 78 | 60   | 83     | 100 | 100  | 80     |
| Hipervacuolización de cd         | 71              | 47 | 69   | 33       | 77 | 89   | 33        | 89 | 40   | 50     | 20  | 20   | 53     |
| Hiperplasia de cb                | 21              | 67 | 19   | 8        | 54 | 56   | 22        | 78 | 50   | 33     | 80  | 80   | 47     |
| Granulocitoma                    | 0               | 7  | 0    | 0        | 15 | 11   | 0         | 0  | 0    | 0      | 20  | 0    | 4      |
| Fibrosis                         | 14              | 20 | 13   | 33       | 15 | 67   | 11        | 22 | 20   | 17     | 0   | 0    | 19     |
| Atrofia del epitelio             | 50              | 40 | 44   | 42       | 38 | 56   | 11        | 67 | 30   | 50     | 60  | 100  | 49     |
| Necrosis                         | 0               | 0  | 0    | 33       | 8  | 11   | 11        | 0  | 0    | 17     | 0   | 0    | 7      |

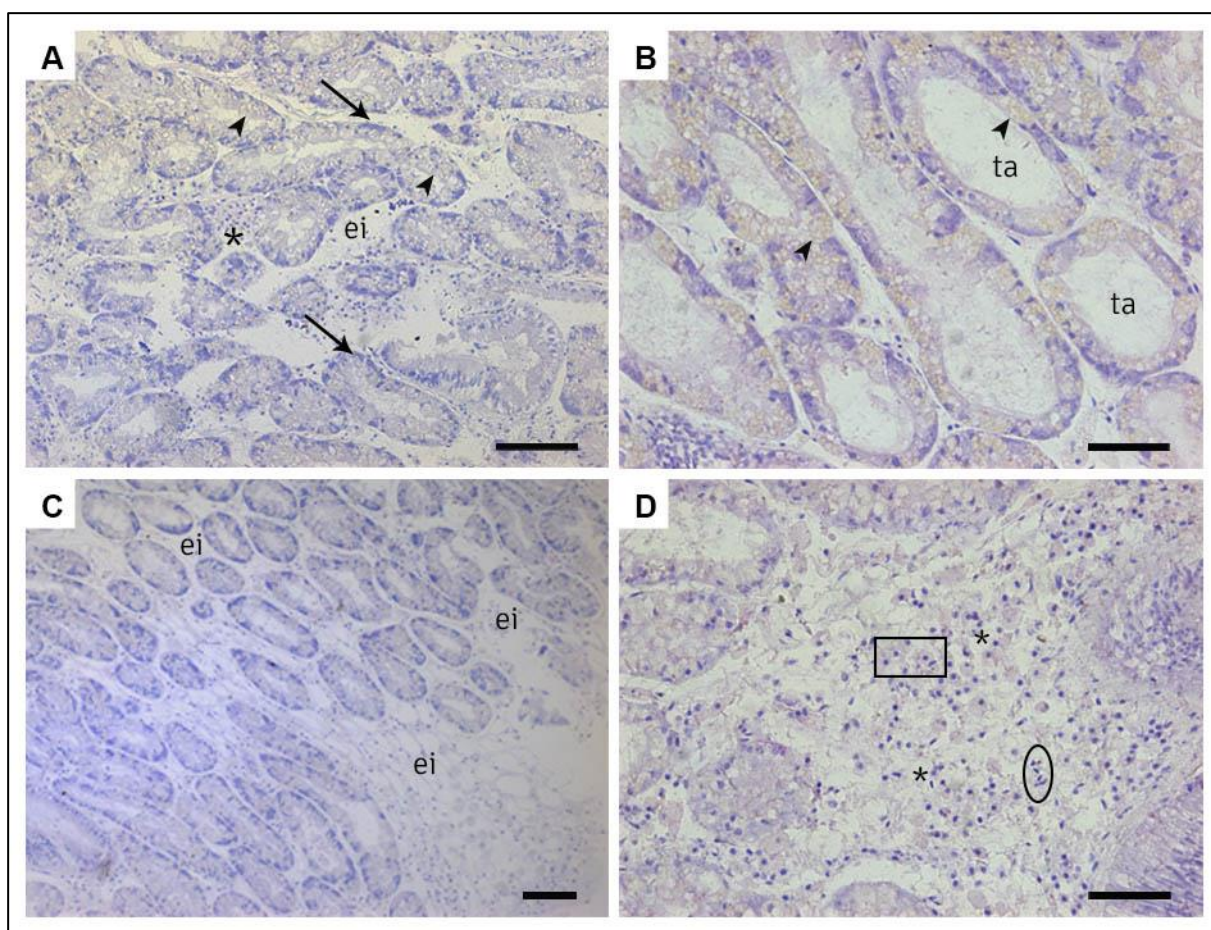
cb: células basófilas; cd: células digestivas; LF: lipofuscinas; tc: tejido conectivo.

**Tabla I.13.** Intensidad media de alteraciones histopatológicas registradas en la glándula digestiva de *Brachidontes rodriguezii* en los distintos sitios de estudio y temporadas, basadas en la escala semicuantitativa (0 = sin alteración; valores aproximados a: 1 = intensidad leve; 2 = intensidad moderada y 3 = intensidad alta).

|                                   | Otoño |     |      | Invierno |     |      | Primavera |     |      | Verano |     |      |
|-----------------------------------|-------|-----|------|----------|-----|------|-----------|-----|------|--------|-----|------|
|                                   | PB    | PC  | PMdP | PB       | PC  | PMdP | PB        | PC  | PMdP | PB     | PC  | PMdP |
| <b>Alteración histopatológica</b> | PB    | PC  | PMdP | PB       | PC  | PMdP | PB        | PC  | PMdP | PB     | PC  | PMdP |
| Infiltración hemocítica           | 1,2   | 1,4 | 1,3  | 1,3      | 1,8 | 1,5  | 1,5       | 2,0 | 1,4  | 1,5    | 1   | 1,5  |
| Aumento del espacio intertubular  | 1,8   | 1,9 | 1,6  | 1,6      | 2,5 | 2    | 1,0       | 1,4 | 1,0  | 2,2    | 2,3 | 1,5  |
| Células pigmentadas en tc         | 1     | 1   | 1    | 0        | 0   | 1    | 0         | 0   | 1,0  | 1      | 0   | 0    |
| Agregados simil-LF                | 2,4   | 2,4 | 2,8  | 2        | 2,3 | 2    | 2,0       | 1,9 | 2,3  | 1,8    | 2,8 | 3    |
| Hipervacuolización de cd          | 1,8   | 1,6 | 1,6  | 1,5      | 2,2 | 1,9  | 1,7       | 2,3 | 1,5  | 1,7    | 3   | 2    |
| Hiperplasia de cb                 | 1,7   | 1,9 | 1,7  | 1        | 1,9 | 2    | 2,0       | 2,3 | 1,8  | 1      | 2   | 2,8  |
| Granulocitoma                     | 0     | 1   | 0    | 0        | 1   | 1    | 0         | 0   | 0    | 0      | 1   | 0    |
| Fibrosis                          | 1     | 1   | 1    | 1,3      | 1   | 1    | 1,0       | 1,0 | 1,0  | 1      | 0   | 0    |
| Atrofia del epitelio              | 1,7   | 1,5 | 1,4  | 1        | 1,2 | 2    | 1,0       | 1,5 | 2,0  | 2      | 2   | 1,8  |
| Necrosis                          | 0     | 0   | 0    | 2        | 1   | 1    | 2,0       | 0   | 0    | 1      | 0   | 0    |

cb: células basófilas; cd: células digestivas; LF: lipofuscinas; tc: tejido conectivo.

Se observó, para todos los sitios y temporadas, que las tres alteraciones más abundantes fueron los agregados simil-lipofuscinas en células digestivas, el aumento del espacio intertubular y la infiltración hemocítica en el espacio intertubular (Figura I.21 A). Los agregados simil-lipofuscinas en células digestivas, se caracterizaron por la presencia de agregados citoplasmáticos de color amarillo amarronado (Figura I.21 B), y su prevalencia media fue del 80 %, estando presente entre el 50 y 100 % de los casos, con una intensidad entre moderada y alta para todos los sitios y temporadas.



**Figura I.21.** Micrografías de secciones histológicas transversales de la glándula digestiva de *Brachidontes rodriguezii* con distintas alteraciones histopatológicas. **A.** Vista general donde se observa amplio espacio intertubular (ei) con infiltración hemocítica difusa (asterisco). Nótese la presencia de agregados simil-lipofuscinas en las células digestivas (punta de flecha) y la hiperplasia de células basófilas (flecha) **B.** Detalle de túbulos digestivos atrofiados (ta) con células digestivas con agregados simil-lipofuscinas (punta de flecha). **C.** Vista general de un ejemplar con alta intensidad de aumento del espacio intertubular (ei). **D.** Detalle de un ejemplar con alta intensidad de infiltración hemocítica difusa (asterisco). Nótese los dos tipos de hemocitos: hialinocitos (óvalo) y granulocitos (rectángulo). Tinción: hematoxilina-eosina. Escalas: A, C: 100  $\mu$ m; B, D: 50  $\mu$ m.

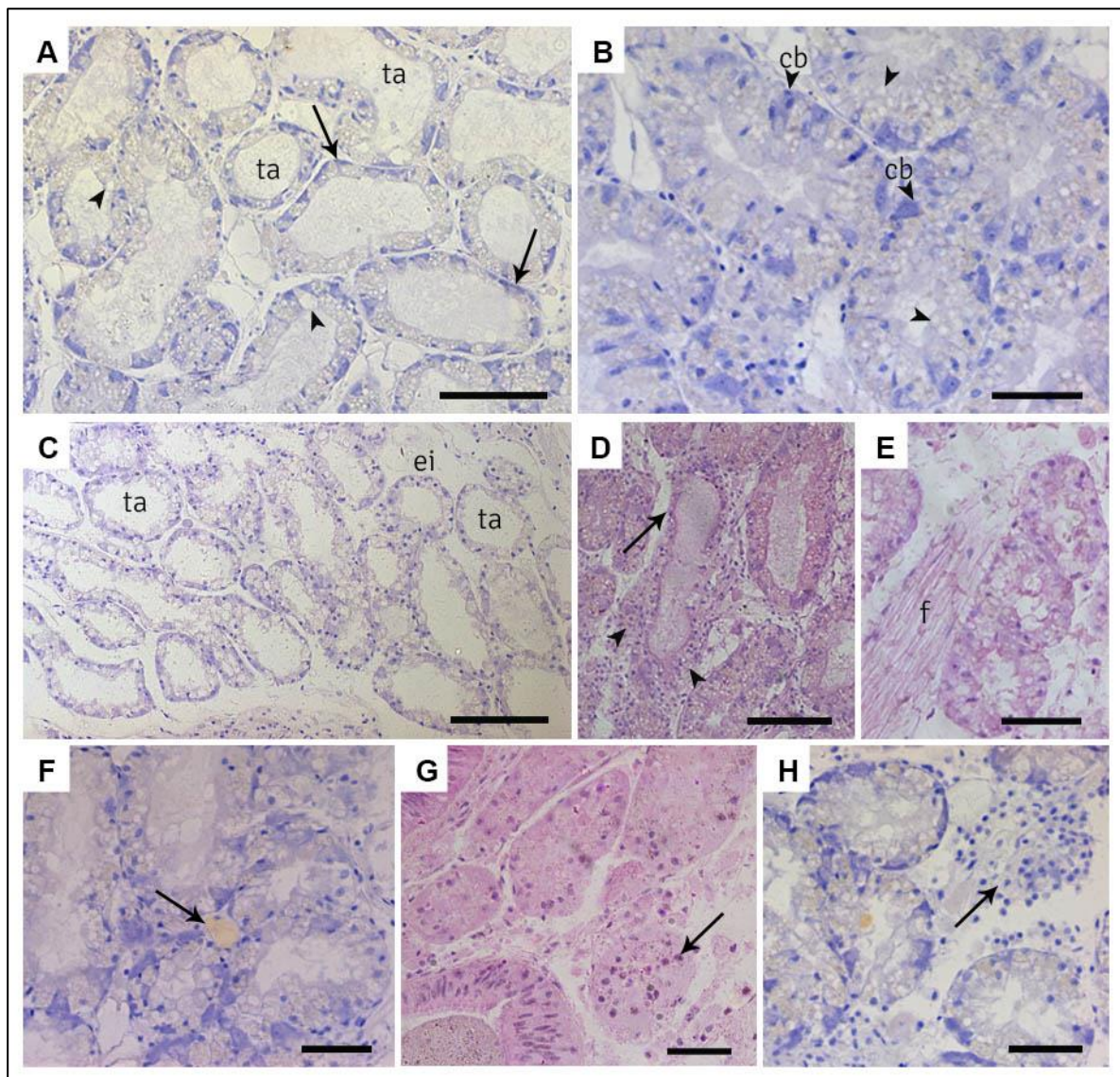
El aumento del espacio intertubular consistió principalmente en la desorganización intersticial del tejido conectivo (Figura I.21 C). Su prevalencia media fue del 63% (33 – 89 %) con una intensidad de leve a moderada para todos los sitios y temporadas. También se observó una prevalencia media del 59% (20 – 89 %) de infiltración hemocítica difusa, caracterizada por el aumento de hemocitos hialinocitos y granulocitos en el tejido intertubular (Figura I.21 D) con una intensidad entre leve y moderada.

La presencia de hipervacuolización en las células digestivas, la hiperplasia en las células basófilas y la presencia del epitelio digestivo atrofiado, también fueron histopatologías observadas en todos los sitios y temporadas, pero con una prevalencia menor (Figuras I.21 A, B, I.22 A-D). La hipervacuolización se caracterizó por un aumento en la cantidad o tamaño de las vacuolas presentes en el citoplasma de las células digestivas (Figuras I.22 A, B). La prevalencia media fue del 53 % en los ejemplares analizados (20-89 %) con intensidad de leve a moderada, excepto para los ejemplares recolectados en PC durante el verano, donde fue severa. La prevalencia de atrofia del epitelio de los túbulos digestivos, caracterizada por un aumento del lumen y una reducción de la altura del epitelio de los túbulos (Figuras I.21 B y I.22 A, C), fue un poco menor (49 %) y estuvo presente entre el 11 y 100 % de los casos con una intensidad de leve a moderada. En algunos ejemplares, como por ejemplo de PC durante invierno, la atrofia fue tan avanzada que solo se observó la membrana basal del epitelio tubular (Figura I.22 D). La hiperplasia de células basófilas (Figura I.22 A, B), caracterizada por el aumento en número de este tipo celular, tuvo una prevalencia media del 47 % (8 - 80 %) y su intensidad fue de leve a moderada. Sin embargo, los ejemplares recolectados en PMdP durante el verano presentaron una intensidad severa para este tipo de daño. En promedio, en el 19 % (0 - 67 %) de los individuos analizados se observó la presencia de fibrosis (Figura I.22 E). Este daño no fue observado en los ejemplares recolectados en PC y PMdP durante el verano.

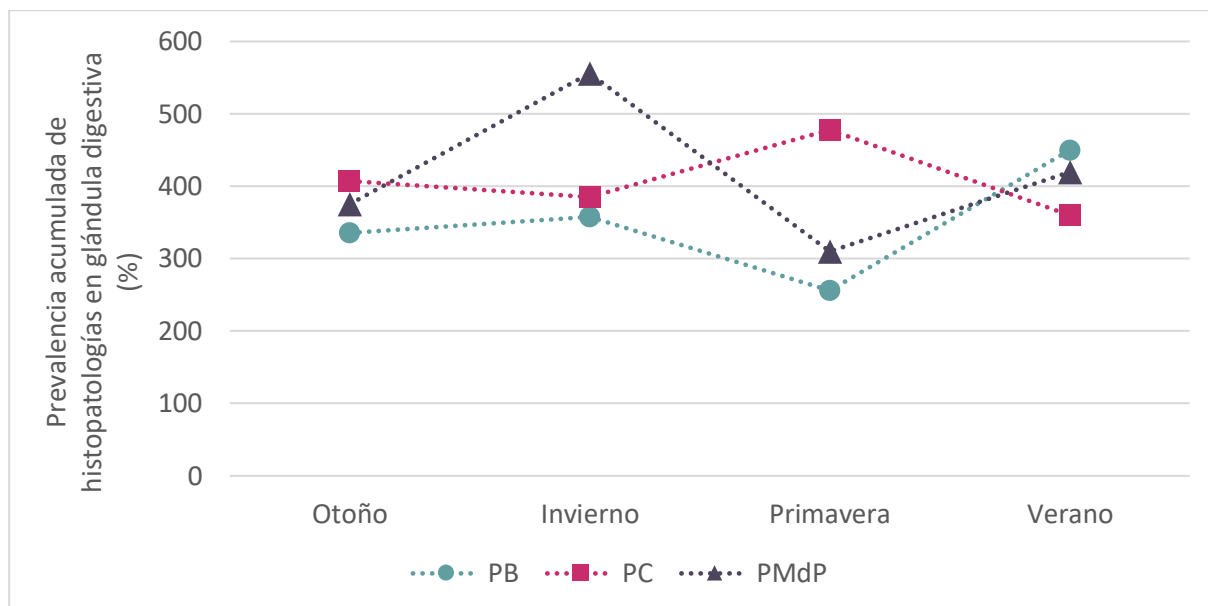
Por último, en promedio, en menos del 10 % de los ejemplares se observaron células pigmentadas en tejido conectivo, necrosis o granulocitomas, todas ellas con una intensidad leve (Figuras I.22 F-H). Las células pigmentadas se observaron principalmente en los ejemplares de los 3 sitios durante otoño, siempre con una intensidad leve. Si bien presentaron

un color amarillento similar al de lipofuscinas, se caracterizaron por ser células con un pequeño núcleo basal y un amplio citoplasma de color parejo, sin la presencia de vesículas como ocurre con los agregados simil-lipofuscinas en las células digestivas (Figura I.22 F). La necrosis, caracterizada por la presencia de núcleos picnóticos, muerte celular y posterior desintegración del tejido se observó en los 3 sitios durante el invierno, con una intensidad leve (Figura I.22 G). El daño con menor prevalencia fue la presencia de granulocitomas —de intensidad leve— conformados por pequeños agregados de granulocitos en el tejido conectivo (Figura I.22 H).

La prevalencia acumulada de las distintas alteraciones en los sitios de estudio y temporadas se representa en la Figura I.23. Allí se puede observar que durante el otoño y el verano la prevalencia acumulada de alteraciones es similar para los tres sitios, mientras que en el invierno el sitio con mayor prevalencia acumulada de alteraciones es PMdP y en primavera PC.



**Figura I.22.** Micrografías de secciones histológicas transversales de la glándula digestiva de *Brachidontes rodriguezii* con distintas alteraciones histopatológicas. **A.** Vista general donde se observa hipervacuolización en las células digestivas (punta de flecha), túbulos con hiperplasia de las células basófilas (flecha) y la presencia túbulos digestivos atrofiados (ta). **B.** Detalle de túbulos con células digestivas con vacuolas de distintos tamaños (punta de flecha) e hiperplasia de células basófilas (cb). **C.** Vista general de un ejemplar con túbulos atrofiados (ta) con aumento del lumen y reducción de la altura del epitelio y aumento del espacio intertubular (ei). **D.** Detalle de un ejemplar con atrofia tubular avanzada, donde solo se observa la membrana basal del epitelio (flecha). Nótese la presencia de infiltración hemocítica rodeando al túbulo (punta de flecha). **E.** Fibrosis (f) en el espacio intertubular. **F.** Célula pigmentada (flecha) de color amarillento en el espacio intertubular. **G.** Necrosis del epitelio de los túbulos digestivos. Nótese la presencia de núcleos picnóticos (flecha) y la desintegración de los túbulos. **H.** Granulocitoma (flecha) en el tejido conectivo. Tinción: hematoxilina-eosina. Escalas: A, C, D: 100  $\mu$ m; B, E-H: 50  $\mu$ m.



**Figura I.23.** Prevalencia acumulada (%) de las alteraciones histopatológicas en la glándula digestiva de *Brachidontes rodriguezii* en los distintos sitios de estudio y temporadas.

### **Daños histológicos en tejido gonadal**

El tejido gonadal de los individuos de *B. rodriguezii* analizados, presentó las características propias de la especie previamente descrita en otros trabajos (Torroglosa y Giménez, 2016, 2019). En resumen, a medida que se desarrolla el ciclo gametogénico, los acinos van ocupando el manto y pueden invadir los demás tejidos hasta alcanzar su tamaño máximo previo a la puesta de las gametas (para una mayor descripción ver 2.2.4 Desarrollo gametogénico e índice gonadal).

La prevalencia (P) de las alteraciones histopatológicas observadas en el tejido gonadal de los ejemplares de los distintos sitios y temporadas, como así también la P media, se representan en la Tabla I.14. La Tabla I.15 presenta la intensidad media observada para las distintas alteraciones.

**Tabla I.14.** Prevalencia media (%) de las alteraciones histopatológicas registradas en el tejido gonadal de *Brachidontes rodriguezii* en los distintos sitios de estudio y temporadas y prevalencia media total (Pm) de cada alteración (%).

|                               | Otoño           |    |      | Invierno |    |      | Primavera |    |      | Verano |    |      |           |
|-------------------------------|-----------------|----|------|----------|----|------|-----------|----|------|--------|----|------|-----------|
|                               | PB              | PC | PMdP | PB       | PC | PMdP | PB        | PC | PMdP | PB     | PC | PMdP |           |
| Alteración histopatológica    | Prevalencia (%) |    |      |          |    |      |           |    |      |        |    |      | Pm (%)    |
| Infiltración hemocítica       | 46              | 44 | 50   | 21       | 47 | 64   | 40        | 60 | 20   | 14     | 20 | 83   | <b>42</b> |
| Células pigmentadas en acinos | 8               | 11 | 6    | 0        | 7  | 45   | 0         | 10 | 20   | 43     | 20 | 67   | <b>20</b> |
| Agregados simil-LF            | 0               | 28 | 22   | 29       | 13 | 18   | 10        | 10 | 30   | 29     | 20 | 67   | <b>23</b> |
| Granulocitoma                 | 0               | 0  | 0    | 0        | 0  | 27   | 0         | 0  | 0    | 0      | 0  | 0    | <b>2</b>  |
| Fibrosis                      | 0               | 0  | 0    | 0        | 0  | 18   | 0         | 0  | 0    | 14     | 0  | 0    | <b>3</b>  |
| Atresia oocitaria             | 0               | 39 | 33   | 14       | 27 | 18   | 10        | 20 | 20   | 29     | 20 | 50   | <b>23</b> |
| Necrosis                      | 0               | 6  | 0    | 0        | 13 | 0    | 0         | 0  | 10   | 0      | 0  | 0    | <b>2</b>  |

LF: lipofuscinas

**Tabla I.15.** Intensidad media de alteraciones histopatológicas registradas en el tejido gonadal de *Brachidontes rodriguezii* en los distintos sitios de estudio y temporadas basada en la escala semicuantitativa (0 = sin alteración; valores aproximados a: 1 = intensidad leve; 2 = intensidad moderada y 3 = intensidad alta).

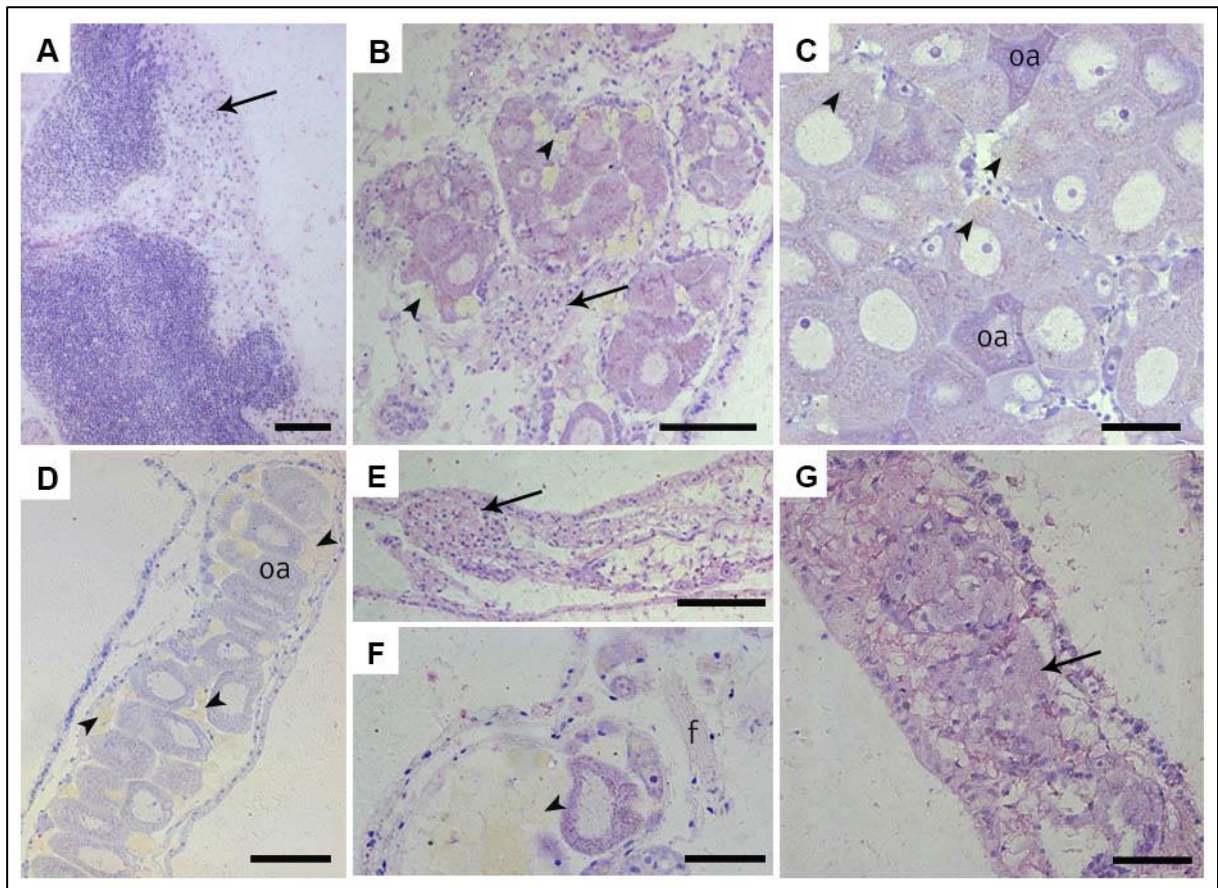
|                               | Otoño |     |      | Invierno |     |      | Primavera |    |      | Verano |    |      |  |
|-------------------------------|-------|-----|------|----------|-----|------|-----------|----|------|--------|----|------|--|
|                               | PB    | PC  | PMdP | PB       | PC  | PMdP | PB        | PC | PMdP | PB     | PC | PMdP |  |
| Infiltración hemocítica       | 1,7   | 1,8 | 1,4  | 1        | 1,7 | 1,9  | 1,3       | 2  | 1    | 1      | 3  | 1,4  |  |
| Células pigmentadas en acinos | 1     | 1   | 1    | 0        | 3   | 2,4  | 0         | 1  | 1    | 2,7    | 3  | 1    |  |
| Agregados simil-LF            | 0     | 1,8 | 2,5  | 1,8      | 2   | 1,5  | 1         | 2  | 1,3  | 2      | 2  | 2    |  |
| Granulocitoma                 | 0     | 0   | 0    | 0        | 0   | 1    | 0         | 0  | 0    | 0      | 0  | 0    |  |
| Fibrosis                      | 0     | 0   | 0    | 0        | 0   | 1    | 0         | 0  | 0    | 1      | 0  | 0    |  |
| Atresia oocitaria             | 0     | 1,6 | 1,7  | 2        | 2,5 | 2,5  | 1         | 1  | 1    | 2,5    | 2  | 2,3  |  |
| Necrosis                      | 0     | 3   | 0    | 0        | 2   | 0    | 0         | 0  | 1    | 0      | 0  | 0    |  |

LF: lipofuscinas

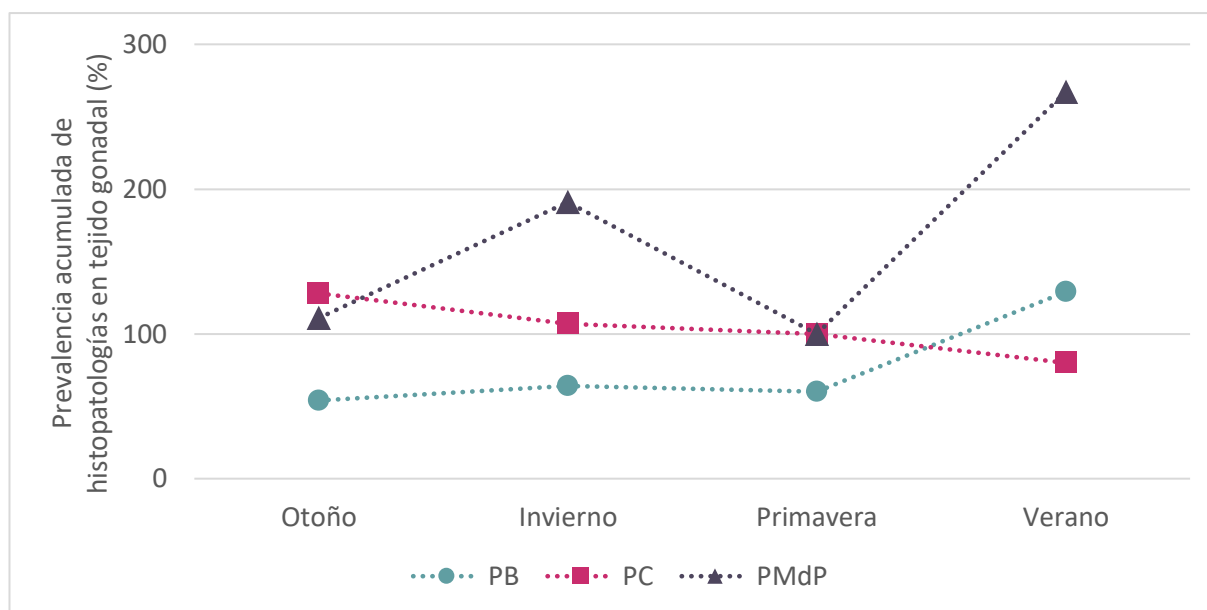
Se observó, para todos los sitios y temporadas, que las alteraciones presentes en machos fueron la infiltración hemocítica, la formación de granulocitomas, la presencia de células pigmentadas y fibrosis, mientras en las hembras, además de estas alteraciones, se observó atresia oocitaria y necrosis (Figura I.24). La alteración más abundante fue la infiltración hemocítica difusa alrededor de los acinos gonadales (Figuras I.24 A, B). Su

prevalencia media fue del 42 % (14 - 83 %) con una intensidad de leve a alta (PC durante el verano). Seguido a esto, las tres alteraciones más abundantes fueron la presencia de agregados simil-lipofuscinas, la atresia oocitaria (en hembras) y la presencia de células pigmentadas. El agregado de simil-lipofuscinas fue observado en los oocitos y se caracterizó por la presencia de inclusiones citoplasmáticas de color amarillo amarronado (Figura I.24 C). Su prevalencia media fue del 23 %, y estuvo presente entre el 0 y 67 % de los casos con una intensidad de leve a moderada en todos los sitios y temporadas excepto en PB durante el otoño que fue nula. Las células pigmentadas, fueron similares a las descritas para la glándula digestiva, pero a diferencia de ese órgano no se observaron aisladas en el tejido conectivo sino agrupadas y principalmente dentro de los acinos (Figuras I.24 B, D, F). Generalmente, las hembras que presentaban estas dos últimas alteraciones, también presentaban atresia oocitaria (Figuras I.24 B-D), cuya prevalencia fue del 23 % (0 – 50 %). En general, la intensidad media de este daño para los 3 sitios fue leve en primavera y otoño y moderada en invierno y verano. La presencia de granulocitomas fue baja (2 %), y únicamente en ejemplares de PMdP en invierno (27 %) con una intensidad leve (Figura I.24 E). Además, se observó la presencia de fibrosis en este mismo sitio y temporada (Figura I.24 F), pero con menor prevalencia (18 %) y también en los ejemplares de PB recolectados en verano (14 %). Por último, se observó necrosis del tejido gonadal (Figura I.24 G) en hembras recolectadas de PC en otoño (6 %) e invierno (14 %) con intensidad alta y moderada respectivamente y en hembras de PMdP en primavera (10 %), con intensidad leve.

La P acumulada de las distintas alteraciones en los sitios de estudio y temporadas se representa en la Figura I.25. En otoño y verano la prevalencia acumulada de alteraciones fue similar para los tres sitios, sin embargo, en invierno y en primavera el sitio con mayor prevalencia acumulada de alteraciones en el tejido gonadal fue PMdP.



**Figura I.24.** Micrografías de secciones histológicas transversales del tejido gonadal de machos y hembras de *Brachidontes rodriguezii* con distintas alteraciones histopatológicas. **A-B.** Infiltración hemocítica (flecha) alrededor de acinos de un macho (A) y de una hembra (B). Nótese en la hembra la presencia de células pigmentadas dentro de los acinos (punta de flecha) e infiltración hemocítica (flecha). **C.** Agregados simil-lipofuscinas en oocitos maduros (punta de flecha) y algunos oocitos atrésicos (oa). **D.** Células pigmentadas (punta de flecha) dentro de un acino entre oocitos atrésicos (oa). **E.** Granulocitoma (flecha) dentro del acino de una hembra. **F.** Fibrosis (f) en el tejido gonadal de una hembra. Nótese la presencia de células pigmentadas (punta de flecha). **G.** Acino de una hembra necrótico (flecha). Tinción: hematoxilina-eosina. Escalas: A, B, D, E: 100  $\mu$ m; C, F, G: 50  $\mu$ m.



**Figura I.25.** Prevalencia acumulada (%) de las alteraciones histopatológicas en el tejido gonadal de *Brachidontes rodriguezii* en los distintos sitios de estudio y temporadas.

## Parasitosis

Los únicos parásitos observados en la glándula digestiva y el tejido gonadal fueron trematodos digeneos que podrían pertenecer a la familia Bucephalidae (Cremonte comunicación personal). En la Tabla I.16 se representa la prevalencia media y la intensidad media en los distintos sitios y temporadas estudiados. En la Figura I.26 pueden observarse los diversos estadios de desarrollo, principalmente en la forma de esporocistos con esferas germinales y cercarias (Figura I.26 D). Como el objetivo del análisis fue realizar una identificación de los distintos tipos de parásitos presentes en los ejemplares de los sitios de estudio, los mismos fueron simplemente identificados como “trematodos” sin importar el estadio de desarrollo en el que se encontraran.

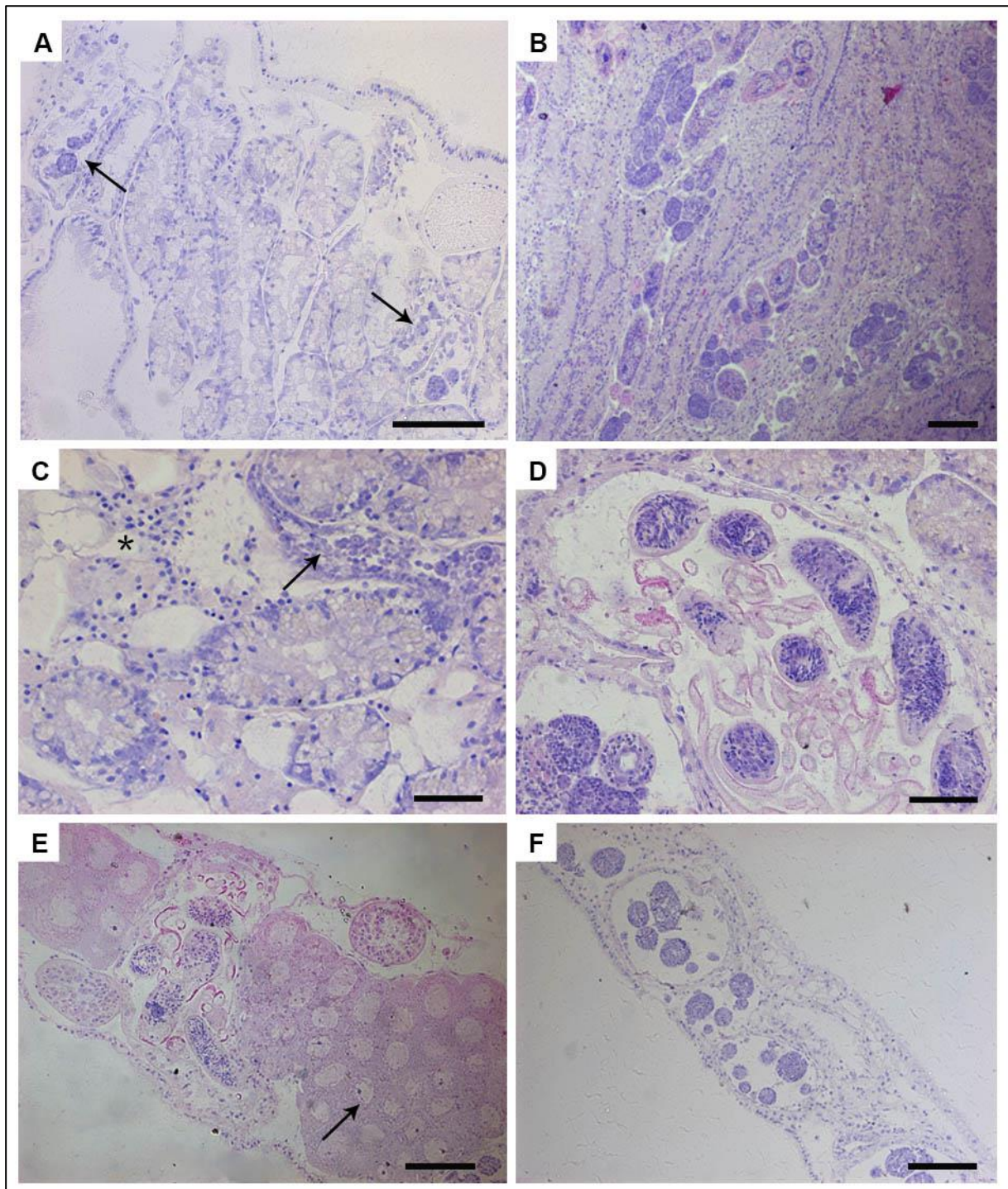
**Tabla I.16.** Prevalencia media (%) e intensidad media de parásitos trematodos en la glándula digestiva y tejido gonadal de *Brachidontes rodriguezii* en los distintos sitios de estudio y temporadas. Los valores de intensidad están basados en la escala semicuantitativa descripta (0 = sin alteración; valores aproximados a: 1 = intensidad leve; 2 = intensidad moderada y 3 = intensidad alta).

|                           | Otoño |    |      | Invierno |     |      | Primavera |    |      | Verano |    |      |
|---------------------------|-------|----|------|----------|-----|------|-----------|----|------|--------|----|------|
| TREMATODOS                | PB    | PC | PMdP | PB       | PC  | PMdP | PB        | PC | PMdP | PB     | PC | PMdP |
| <b>Glándula digestiva</b> |       |    |      |          |     |      |           |    |      |        |    |      |
| Prevalencia (%)           | 7     | 7  | 0    | 8        | 23  | 0    | 22        | 0  | 0    | 0      | 0  | 0    |
| Intensidad                | 2     | 1  | 0    | 1        | 1,7 | 0    | 2         | 0  | 0    | 0      | 0  | 0    |
| <b>Tejido gonadal</b>     |       |    |      |          |     |      |           |    |      |        |    |      |
| Prevalencia (%)           | 15    | 6  | 0    | 14       | 20  | 0    | 20        | 30 | 0    | 0      | 0  | 0    |
| Intensidad                | 3     | 3  | 0    | 3        | 3   | 0    | 2,5       | 2  | 0    | 0      | 0  | 0    |

En los ejemplares recolectados en PB y PC se observó, en la glándula digestiva, la presencia de trematodos con distintos grados de intensidad media de infección (Tabla I.16, Figura I.26 A-D). No se observó presencia de trematodos en los ejemplares recolectados de PMdP de ninguna temporada ni tampoco en los de PB y PC durante verano (Tabla I.15). En otoño, los ejemplares recolectados en PB y PC presentaron igual prevalencia de trematodos (7 %) pero la intensidad de PB fue moderada (Figura I.26 B) mientras que la de PC fue leve (Figura I.26 A). Durante invierno, se observó que la prevalencia e intensidad de trematodos fue mayor en los ejemplares recolectados en PC (P = 23%, I = moderada) en comparación con los ejemplares de PB (P = 8%, I = leve). Durante primavera solo se observaron trematodos en los ejemplares de PB con una prevalencia del 22 % e intensidad moderada (Tabla I.16).

En el tejido gonadal se observaron esporocistos y cercarias invadiendo los acinos (Figura I.26 E) hasta producir la castración total (Figura I.26 F). En dichas ocasiones, la intensidad de infección fue tan alta que resultó imposible determinar el sexo de los ejemplares. Al igual que en la glándula digestiva, no se observó presencia de parásitos en el tejido gonadal de los ejemplares recolectados en PMdP para ninguna de las temporadas, y la temporada de verano fue la única en la que tampoco se registraron casos en PB y PC (Tabla I.16). En el resto de las temporadas, la prevalencia de trematodos fue mayor en los ejemplares de PC

que los de PB a excepción del otoño donde fue mayor en PB. En esta temporada, la prevalencia de parásitos fue del 15 % en los ejemplares recolectados en PB y del 6 % en los de PC, pero en ambos la intensidad fue alta. Durante invierno, la prevalencia en PB fue similar (14 %) pero aumentó en PC (20 %) y la intensidad se mantuvo alta para ambos sitios. En primavera, la prevalencia de trematodos fue la mayor de todas las temporadas para ambos sitios ( $P_{PB} = 20$  y  $P_{PC} = 30$  %), aunque la intensidad en los ejemplares de PC disminuyó de alta a moderada con respecto a la temporada anterior (Tabla I.16).



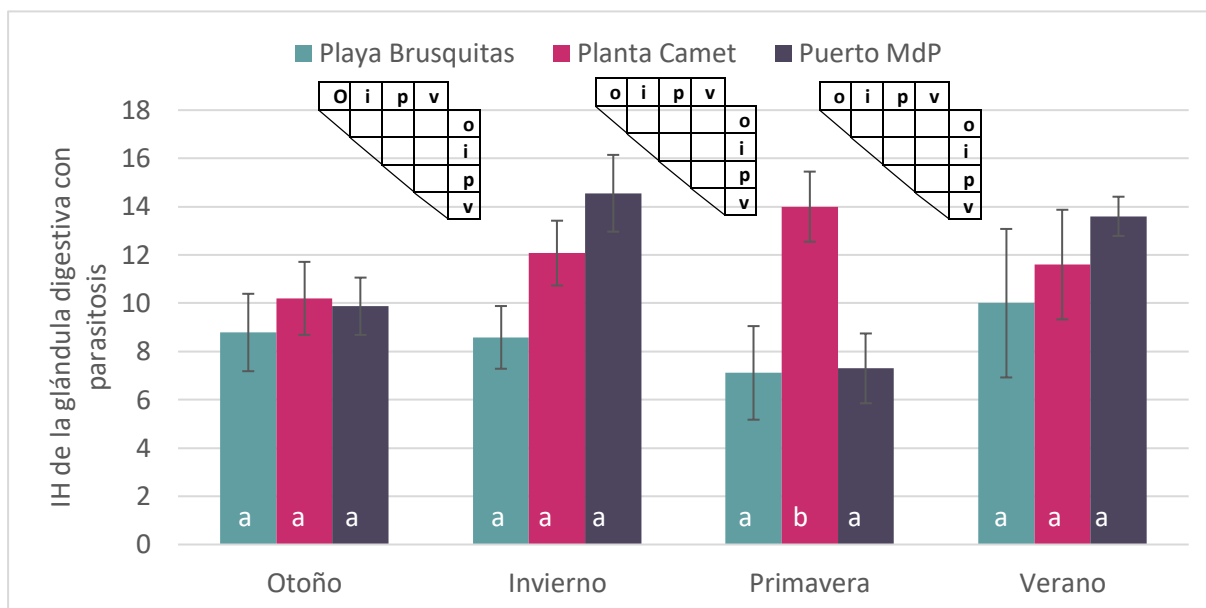
**Figura 1.26.** Micrográficas de secciones histológicas transversales de la glándula digestiva y tejido gonadal de *Brachidontes rodriguezii* con parásitos digeneos. **A-D.** Glándula digestiva: **A.** Infección de intensidad leve con unos pocos focos de infección (flecha). **B.** Infección de intensidad moderada con varios focos de infección **C.** Esporocisto de trematodos en el espacio intertubular (flecha). Nótese la presencia de infiltración hemocítica difusa en la cercanía (asterisco). **D.** Detalle de esporocistos con esferas germinales y cercarias. **E-F.** Tejido gonadal: **E.** Hembra con algunos acinos infectados y otros con presencia de oocitos maduros (flecha). **F.** Ejemplar castrado en donde se observan todos los acinos infectados. Tinción: hematoxilina-eosina. Escalas: A, B, E-F: 100  $\mu$ m; C, D: 50  $\mu$ m.

## Índice histopatológico en glándula digestiva y tejido gonadal

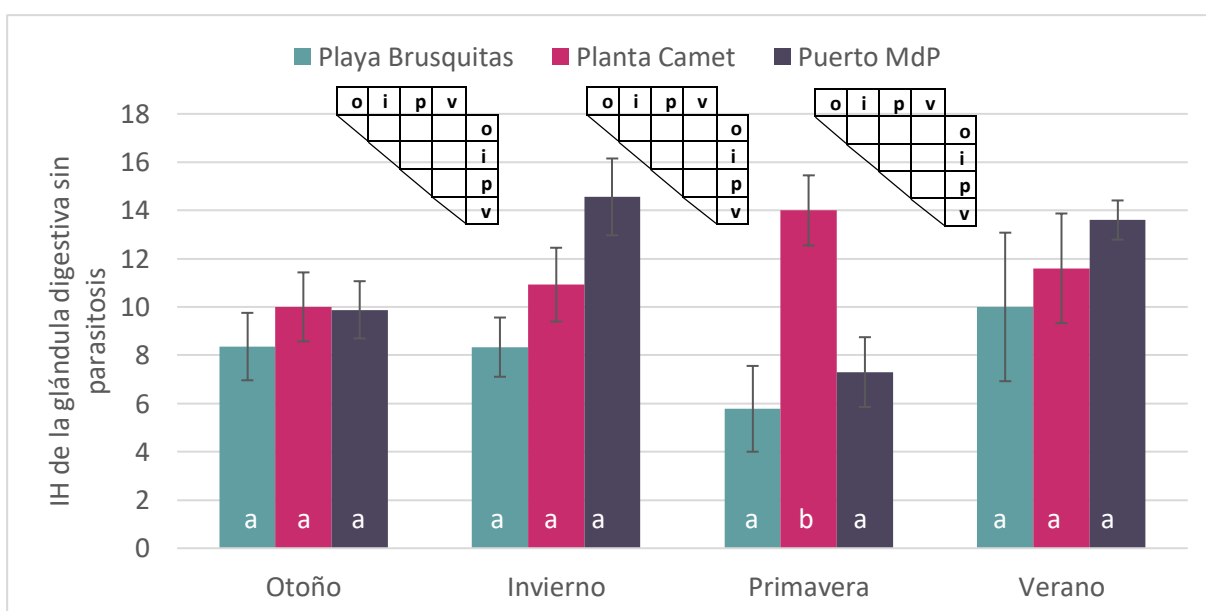
Para el cálculo del índice histopatológico (IH) incluyendo la parasitosis y en base a los resultados observados, a los trematodos se les asignó un peso de 3 por considerarse que se trataba de una patología de severa importancia al provocar impedimentos reproductivos (Ojeda et al., 2021). También se calculó el IH sin la parasitosis.

Al incluir la parasitosis, el intervalo de valores del IH en la glándula digestiva de los individuos recolectados en PB se halló entre  $7,11 \pm 1,94$  y  $10,00 \pm 3,08$  (media  $\pm$  EE), el de los ejemplares de PC entre  $10,20 \pm 1,51$  y  $14,00 \pm 1,45$  (media  $\pm$  EE), y el de los ejemplares recolectados en PMdP se encontró entre  $7,30 \pm 1,45$  y  $14,56 \pm 1,59$  (media  $\pm$  EE) (Figura I.27). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los sitios, pero no entre temporadas ni en la interacción sitio x temporada (Tabla I.10). En invierno, el IH fue significativamente mayor en los ejemplares recolectados en PMdP en comparación con los de PB y los valores del IH para ambos sitios no presentaron diferencias significativas con PC (Figura I.27; comparaciones múltiples de Tukey;  $p < 0,05$ ). En primavera, los ejemplares recolectados en PC presentaron un IH significativamente mayor en comparación con los de PB y PMdP (Figura I.27; comparaciones múltiples de Tukey;  $p < 0,05$ ). Al analizar los valores de IH de cada sitio a lo largo de las distintas temporadas, no se observaron diferencias significativas en ningún sitio (Figura I.27; comparaciones múltiples de Tukey;  $p > 0,05$ ).

Al no incluir la parasitosis, el intervalo de valores del IH en la glándula digestiva de los individuos recolectados en PB se halló entre  $8,36 \pm 1,40$  y  $10,00 \pm 3,08$  (media  $\pm$  EE), el de los ejemplares de PC entre  $10,00 \pm 1,43$  y  $14,00 \pm 1,45$  (media  $\pm$  EE), y el de los ejemplares recolectados en PMdP se encontró entre  $7,30 \pm 1,45$  y  $14,56 \pm 1,59$  (media  $\pm$  EE) (Figura I.28). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los sitios, pero no entre temporadas ni en la interacción sitio x temporada (Tabla I.10). Si bien los valores disminuyeron, al comprar entre sitios se observó la misma tendencia que al considerar la parasitosis (Figura I.28; comparaciones múltiples de Tukey;  $p < 0,05$ ). Al analizar los valores de IH de cada sitio a lo largo de las distintas temporadas, no se observaron diferencias significativas en ningún sitio (Figura I.28; comparaciones múltiples de Tukey;  $p > 0,05$ ).



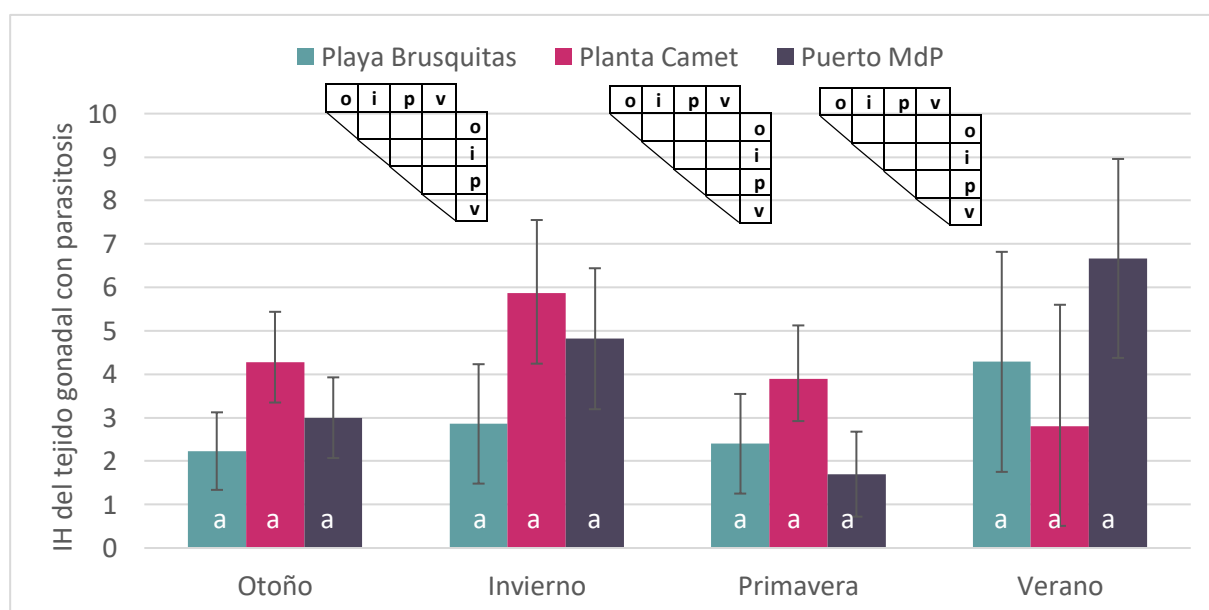
**Figura I.27.** Índice histopatológico (IH) con parasitosis (media  $\pm$  EE) para la glándula digestiva de *Brachidontes rodriguezii* en los distintos sitios de estudio y temporadas. Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios en cada temporada ( $p < 0,05$ ). Las matrices triangulares con asteriscos representan diferencias significativas entre las temporadas para cada sitio ( $p < 0,05$ ). o: Otoño; i: Invierno; p: Primavera; v: Verano.



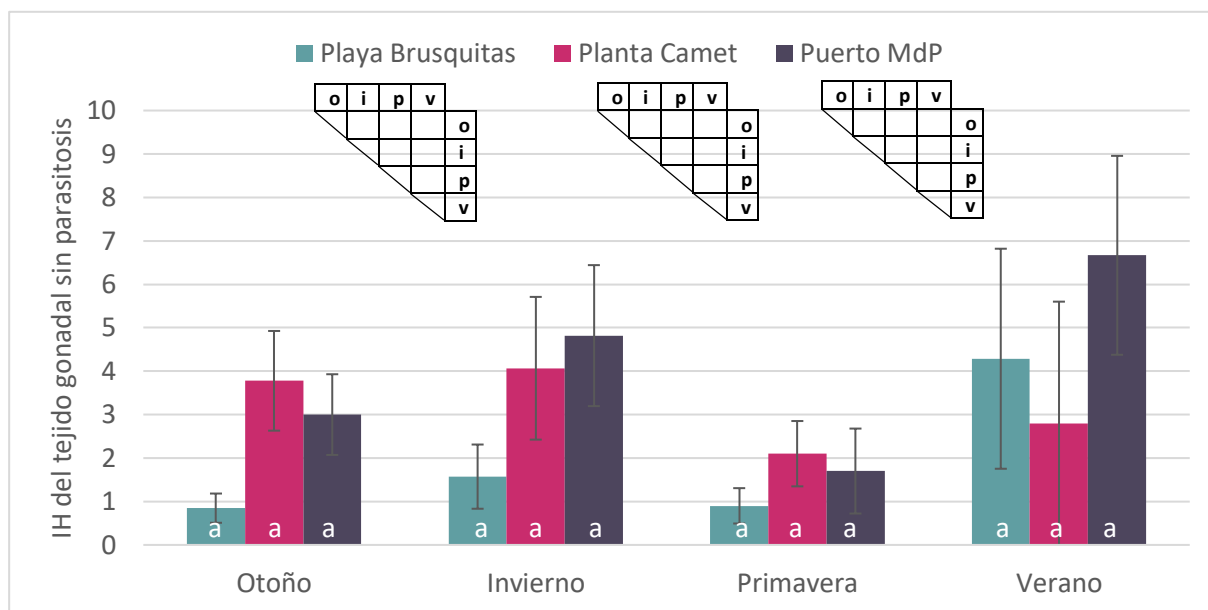
**Figura I.28.** Índice histopatológico (IH) sin parasitosis (media  $\pm$  EE) para la glándula digestiva de *Brachidontes rodriguezii* en los distintos sitios de estudio y temporadas. Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios en cada temporada ( $p < 0,05$ ). Las matrices triangulares con asteriscos representan diferencias significativas entre las temporadas para cada sitio ( $p < 0,05$ ). o: Otoño; i: Invierno; p: Primavera; v: Verano.

En el tejido gonadal, al incluir la parasitosis, el intervalo de valores del IH de los individuos recolectados en PB se halló entre  $2,23 \pm 0,89$  y  $4,29 \pm 2,53$  (media  $\pm$  EE), el de los ejemplares de PC entre  $2,80 \pm 2,80$  y  $5,87 \pm 1,68$  (media  $\pm$  EE), y el de los ejemplares recolectados en PMdP se encontró entre  $1,70 \pm 0,98$  y  $6,67 \pm 2,29$  (media  $\pm$  EE). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los sitios, entre temporadas ni en su interacción (Tabla I.10, Figura I.29).

Sin incluir la parasitosis, los valores del IH de los ejemplares recolectados en PB se encontraron entre  $0,85 \pm 0,24$  y  $4,29 \pm 2,53$  (media  $\pm$  EE), en los ejemplares de PC entre  $2,10 \pm 0,75$  y  $4,07 \pm 1,64$  (media  $\pm$  EE) y el de los individuos recolectados en PMdP entre  $1,70 \pm 0,98$  y  $6,67 \pm 2,29$  (media  $\pm$  EE). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los sitios, entre temporadas ni en su interacción (Tabla I.10, Figura I.30).



**Figura I.29.** Índice histopatológico (IH) sin parasitosis (media  $\pm$  EE) para el tejido gonadal de *Brachidontes rodriguezii* en los distintos sitios de estudio y temporadas. Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios en cada temporada ( $p < 0,05$ ). Las matrices triangulares con asteriscos representan diferencias significativas entre las temporadas para cada sitio ( $p < 0,05$ ). o: Otoño; i: Invierno; p: Primavera; v: Verano.

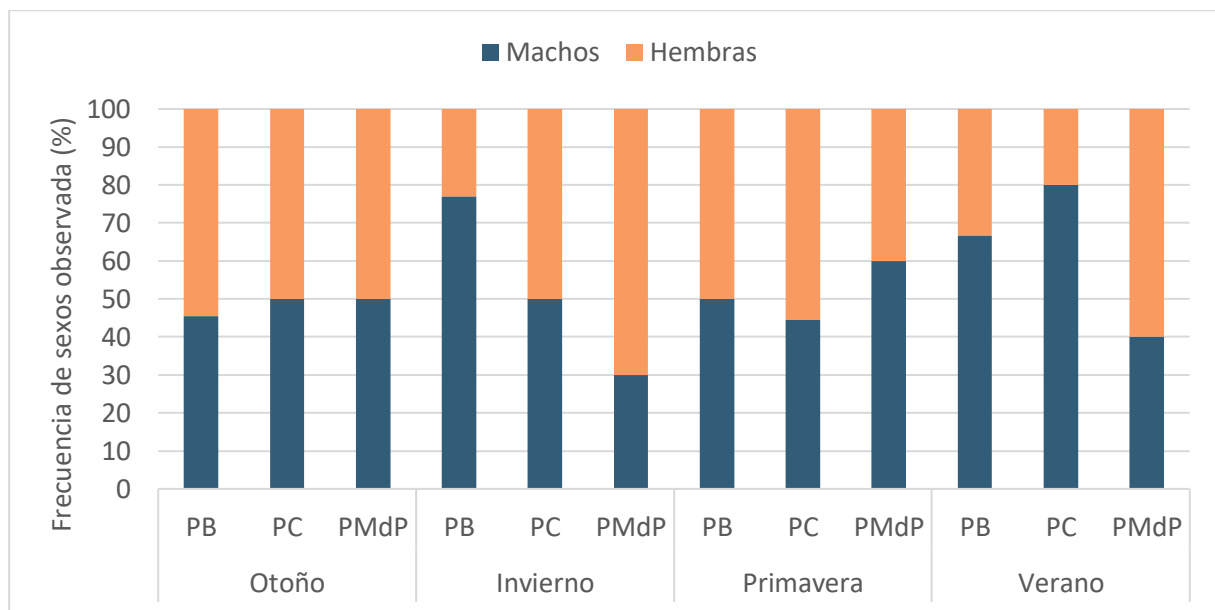


**Figura I.30.** Índice histopatológico (IH) sin parasitosis (media  $\pm$  EE) para el tejido gonadal de *Brachidontes rodriguezii* en los distintos sitios de estudio y temporadas. Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios en cada temporada ( $p < 0,05$ ). Las matrices triangulares con asteriscos representan diferencias significativas entre las temporadas para cada sitio ( $p < 0,05$ ). o: Otoño; i: Invierno; p: Primavera; v: Verano.

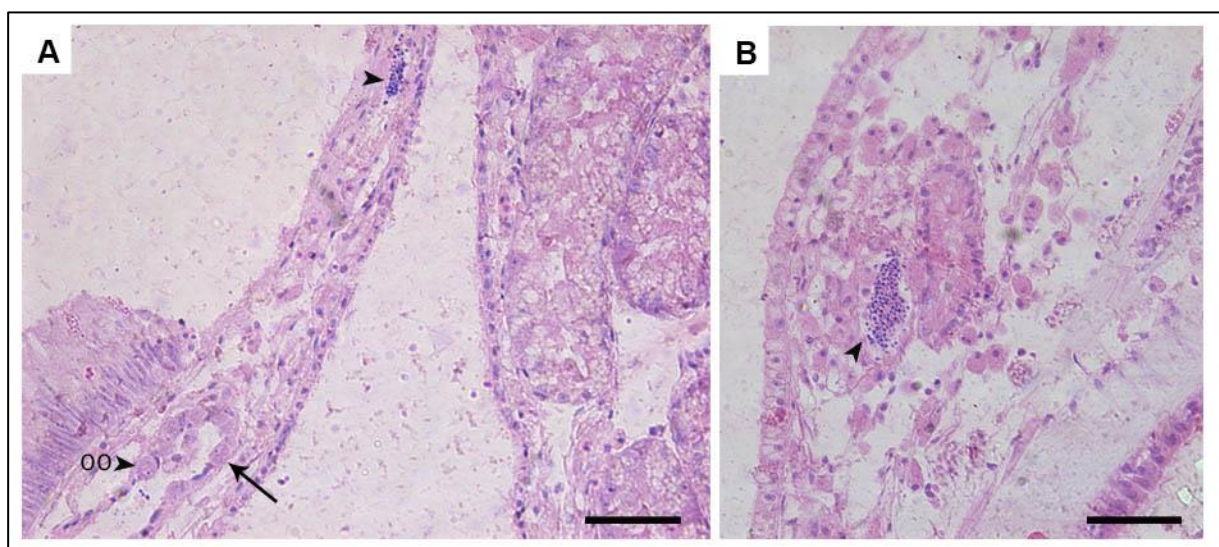
## 2.2.4 Respuestas fisiológicas

### Desarrollo gametogénico e índice gonadal

Se calculó la frecuencia de sexos de PB, PC y PMdP para cada temporada (Figura I.31) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la frecuencia esperada 1:1 ( $p > 0,05$ ). Se encontró un único individuo con características de intersexo recolectado en PMdP durante el invierno (Figura I.32).



**Figura I.31.** Frecuencias de sexos de *Brachidontes rodriguezii* observadas en los distintos sitios de estudio y temporadas.

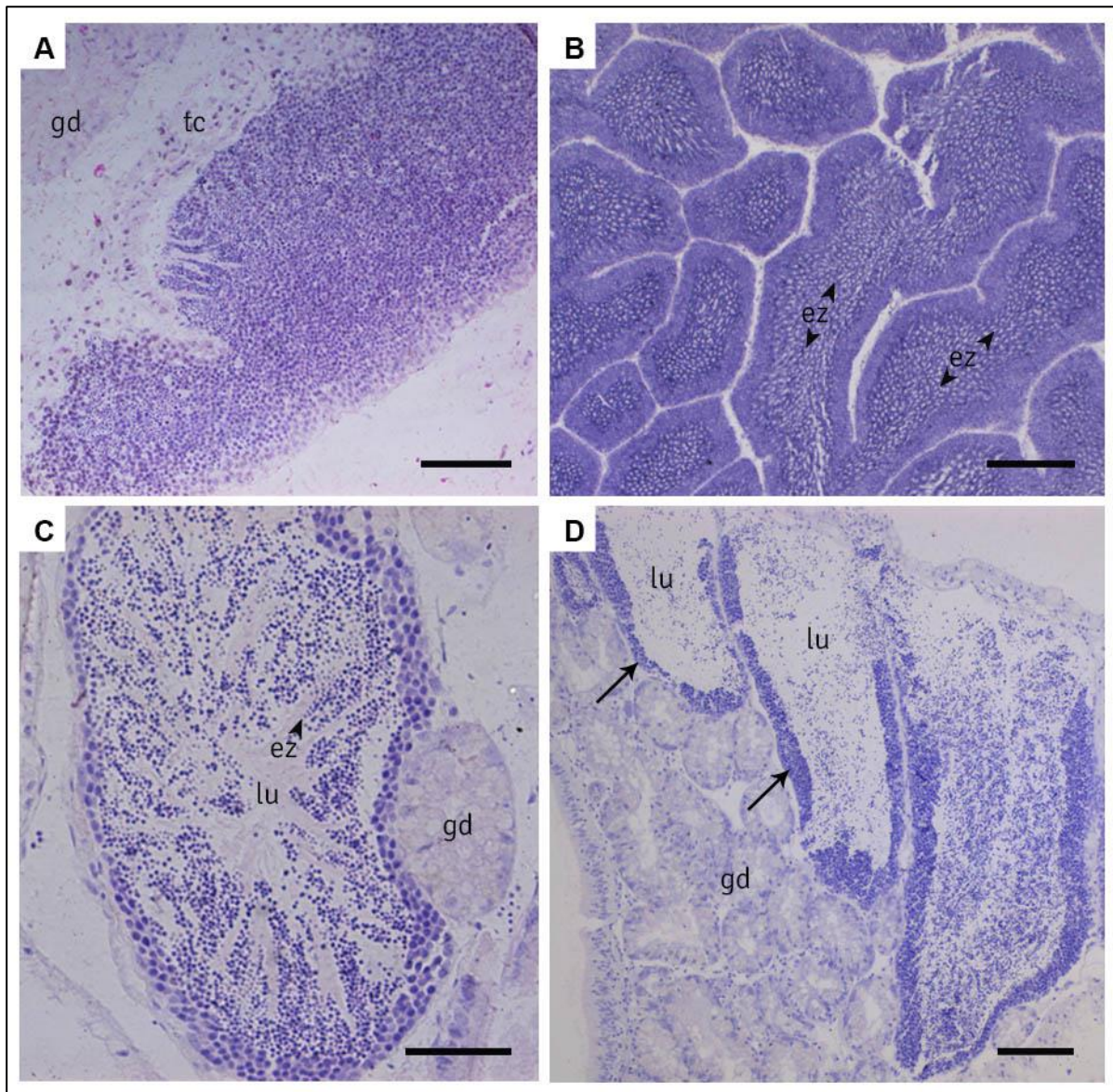


**Figura I.32.** Micrografías del tejido gonadal de un individuo de *Brachidontes rodriguezii* recolectado en PMdP durante invierno, que presenta características de intersexo. Nótese la presencia de acinos masculinos inmaduros (punta de flecha) entre acinos femeninos (flecha) con oogonias (oo). Tinción: hematoxilina-eosina. Escala: 50  $\mu$ m.

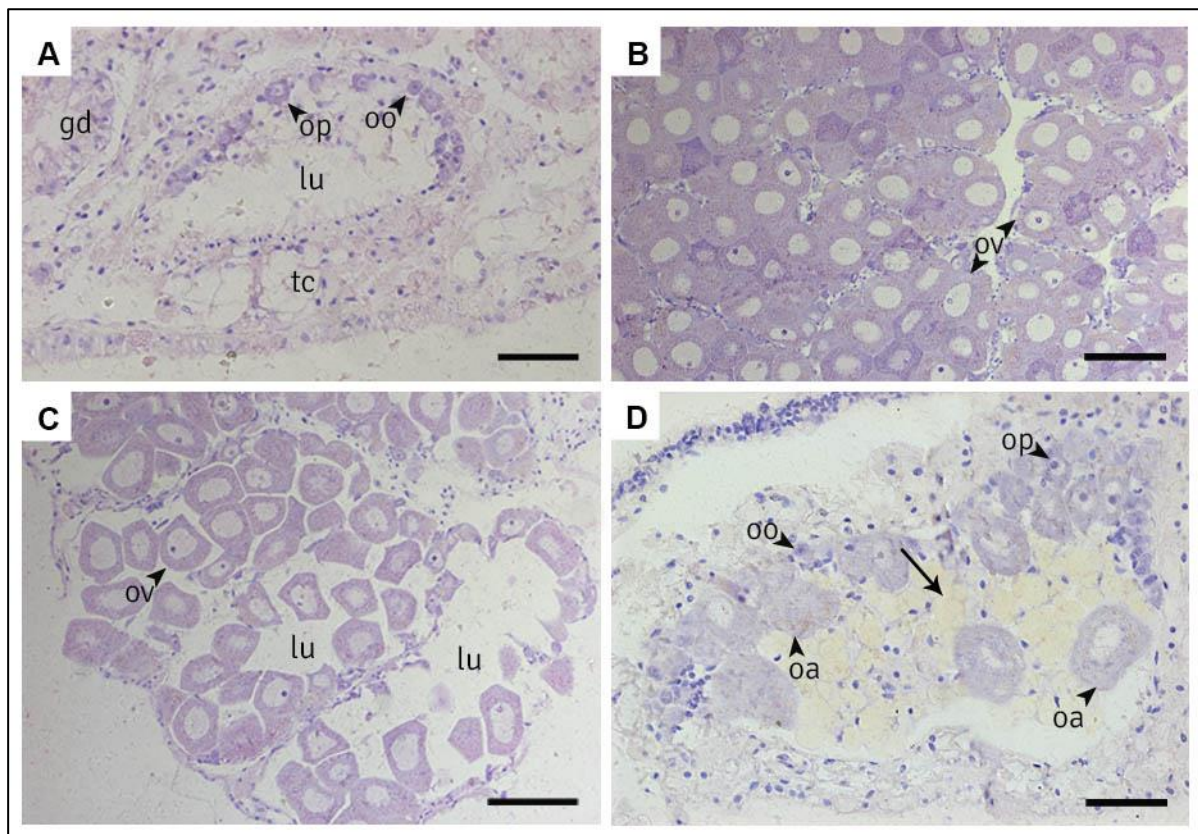
Debido a la presencia de parásitos, del total de individuos analizados para cada sitio se observó un 11 % de ejemplares castrados en PB y un 15 % en PC. En PMdP no se observó la presencia de parásitos ni individuos castrados (Tabla I.15). Los individuos que no estaban castrados fueron utilizados para analizar el desarrollo gametogénico en los distintos sitios y

temporadas de estudio. En las Figuras I.33 y I.34 se observan algunos ejemplos de los diferentes estadios observados, no se observó ningún individuo en el estadio de reposo. En machos, el estadio de desarrollo se caracterizó principalmente por la presencia de células espermatogénicas creciendo hacia el lumen del acino y baja presencia de espermatozoides (Figura I.33 A). En el estadio maduro, los acinos aumentaron su tamaño y se encontraron repletos de espermatozoides, el tejido conectivo circundante se redujo (Figura I.33 B). En el estadio de puesta se observó una reducción en la cantidad de espermatozoides presentes en el lumen, indicio de su liberación, y escasas células en espermatogénesis (Figura I.33 C). Finalmente, en el estadio de post-puesta, los acinos presentaron un amplio lumen con escasos espermatozoides y células de la serie espermatogénica comenzando un nuevo ciclo (Figura I.33 D).

En hembras, el estadio de desarrollo se caracterizó por la presencia de pequeños acinos con un amplio lumen y abundante tejido conectivo. Se observaron oogonias y oocitos previtelogénicos adheridos al epitelio de los acinos (Figura I.34 A). Los acinos de las hembras maduras se encontraron completamente ocupados por oocitos vitelogénicos compactados en configuración poligonal (Figura I.34 B). En el estadio de puesta o desove, se observaron en los acinos espacios vacíos, que corresponden a los oocitos que ya fueron liberados, junto con oocitos vitelogénicos desprendidos del epitelio y listos para el desove, aunque algunos continuaban adheridos (Figura I.34 C). En las hembras en post-puesta, se observaron oocitos atrésicos y residuos amarillentos como producto de la degradación de los oocitos que no fueron liberados (Figura I.34 D). Se observaron también algunas oogonias y oocitos previtelogénicos adheridos al epitelio, dando comienzo a un nuevo ciclo (Figura I.34 D).



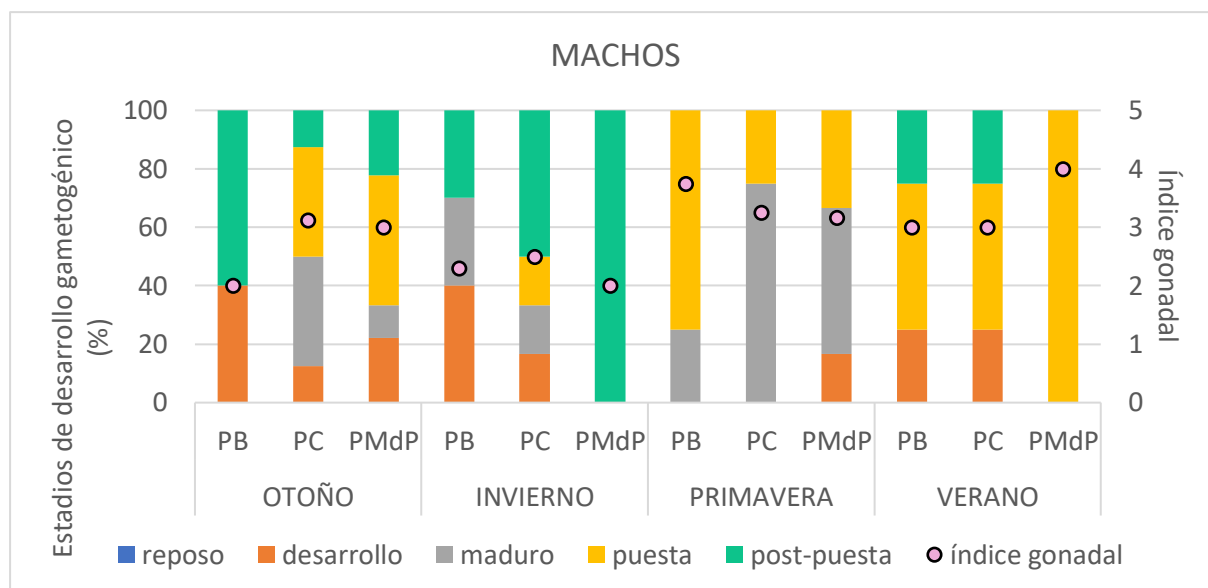
**Figura I.33.** Micrografías del tejido gonadal de machos de *Brachidontes rodriguezii* en distintos estadios del desarrollo gametogénico. **A.** Desarrollo: acino con células espermatogénicas rodeado por tejido conectivo (tc). **B.** Maduro: acino repleto de espermatozoides (ez). **C.** Puesta: acinos en donde se observa el lumen (lu) con escasos espermatozoides (ez). **D.** Post-puesta: acinos con amplio lumen (lu) y cercano al epitelio células espermatogénicas (flecha). gd: glándula digestiva Tinción: hematoxilina-eosina. Escalas: A, C: 100  $\mu$ m; B: 200  $\mu$ m; C: 50  $\mu$ m.



**Figura I.34.** Micrografías del tejido gonadal de hembras de *Brachidontes rodriguezii* en distintos estadios del desarrollo gametogénico. **A.** Desarrollo: acino con amplio lumen (lu) y con oogonias (oo) y oocitos previtelogénicos (op) rodeados por abundante tejido conectivo (tc). **B.** Maduro: acino conformado principalmente por oocitos vitelogénicos (ov). **C.** Puesta: acinos con oocitos vitelogénicos (ov) dispersos por el amplio lumen (lu). **D.** Post-puesta: acino con oocitos atrésicos (oa) y restos amarillentos (flecha). Nótese la presencia de algunas oogonias (oo) y oocitos previtelogénicos (op). gd: glándula digestiva. Tinción: hematoxilina-eosina. Escalas: A, D: 50  $\mu$ m; B, C: 100  $\mu$ m.

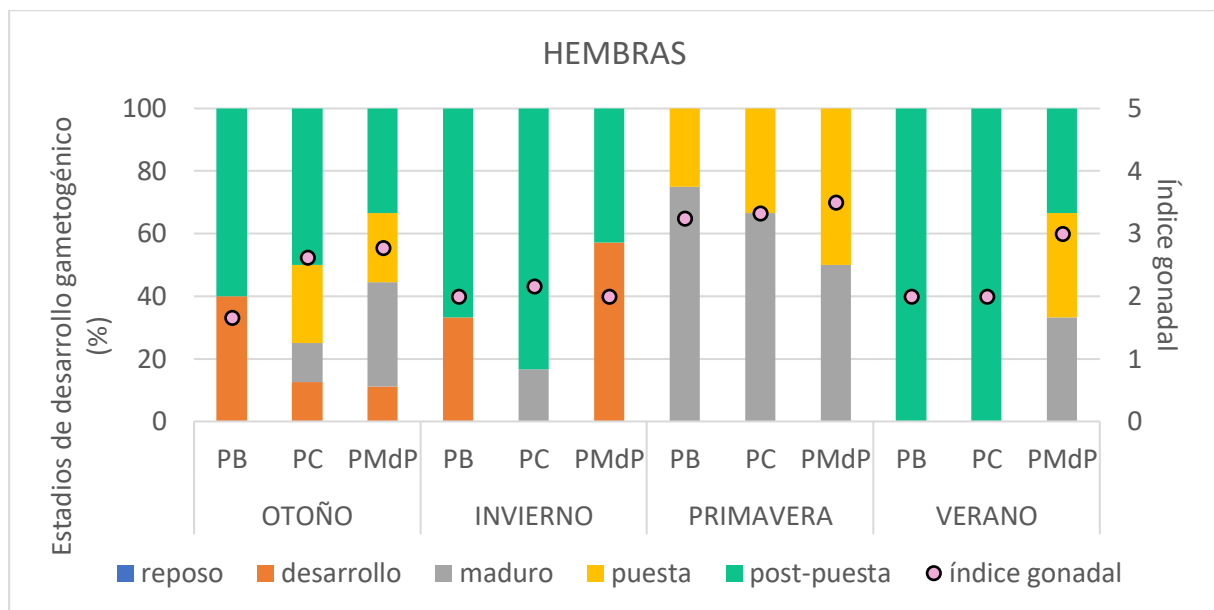
Se observaron diferencias entre los sitios y temporadas para la frecuencia de los estadios de desarrollo gametogénico y el índice gonadal para ambos sexos (Figuras I.35 y I.36). En PB, se observó que el 75 % de los machos se encontraba en periodo de puesta —coincidiendo con el mayor IG— seguido por una puesta parcial durante el verano (50%) (Figura I.35). En PC, en cambio, el periodo de puesta dominante fue observado durante el verano (50%), con puestas parciales durante el otoño (38%), invierno (17%) y primavera (25%) (Figura I.35). En este sitio, el IG se mantuvo relativamente estable durante todas las temporadas, excepto durante el invierno, cuando fue menor. En PMdP, el estadio de puesta se observó en el total de ejemplares recolectados durante el verano —coincidiendo con el

mayor IG— aunque se observaron puestas parciales durante el otoño (44%) y la primavera (33%) (Figura I.35).



**Figura I.35.** Porcentaje del desarrollo gametogénico (representado por barras) e índice gonadal (representado por puntos) de los ejemplares macho de *Brachidontes rodriguezii* en los distintos sitios y temporadas.

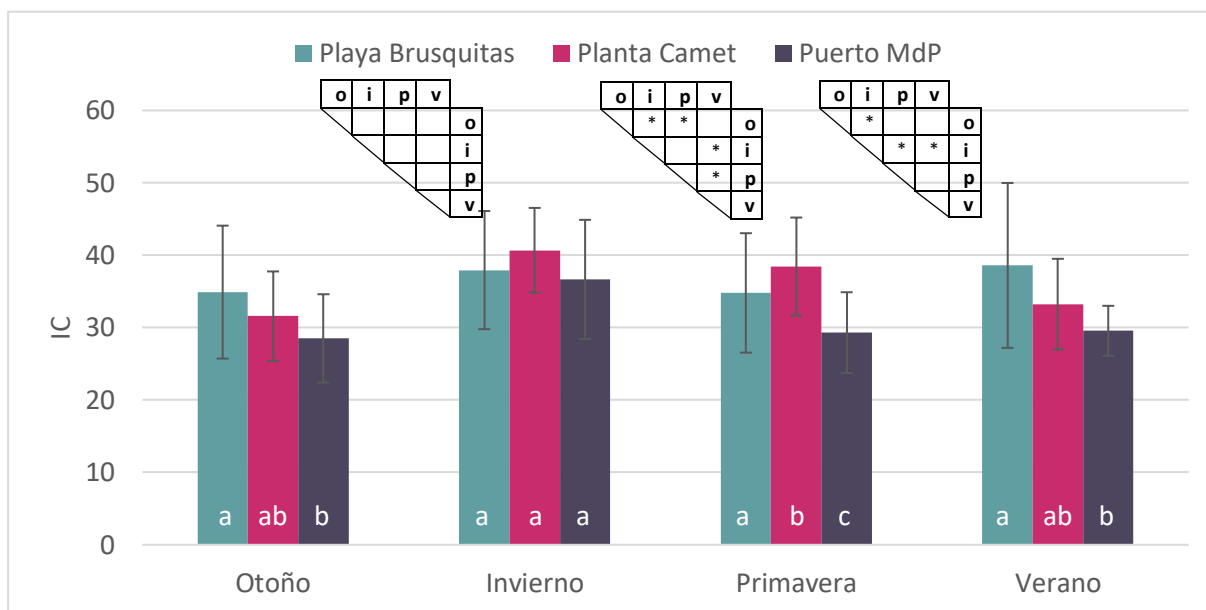
En las hembras, se observó que en PB el periodo de desove (puesta) ocurre durante la primavera, coincidiendo con el IG más alto de todas las temporadas (Figura I.36). Algo similar ocurrió en las hembras de PC, aunque también se observó un desove parcial durante el otoño. En las hembras de PMdP, se observaron pequeños desoves parciales durante la primavera (50%), el verano (33%) y el otoño (22%) (Figura I.36).



**Figura I.36.** Porcentaje del desarrollo gametogénico (representado por barras) e índice gonadal (representado por puntos) de los ejemplares hembra de *Brachidontes rodriguezii* en los distintos sitios y temporadas.

### Índice de condición

El IC en los ejemplares recolectados en PB varió entre  $34,79 \pm 8,25$  y  $38,59 \pm 11,39$  (media  $\pm$  DE), en PC entre  $31,58 \pm 6,18$  y  $3,34 \pm 1,43$  (media  $\pm$  DE), y en PMdP entre  $28,51 \pm 6,10$  y  $36,65 \pm 8,24$  (media  $\pm$  DE) (Figura I.37). En otoño, el valor del IC de los ejemplares recolectados en PB fue significativamente mayor que el de los individuos de PMdP y ambos sitios no presentaron diferencias con PC (Figura I.37; K-W,  $H = 9,37$ ;  $p < 0,05$ ). En invierno no se observaron diferencias significativas (Figura I.37; K-W,  $H = 4,24$ ;  $p > 0,05$ ). En primavera, los ejemplares de PC presentaron un IC significativamente mayor que los de PB y PMdP, siendo este último el de menor valor (Figura I.37; K-W,  $H = 27,11$ ;  $p < 0,05$ ). En verano, se observó el mismo patrón que en otoño (Figura I.37; K-W,  $H = 10,67$ ;  $p < 0,05$ ). Al realizar las comparaciones entre las distintas temporadas en PB no se observaron diferencias significativas (Figura I.37; K-W,  $H = 5,58$ ;  $p > 0,05$ ). En PC se observó que el IC es significativamente mayor en invierno y primavera (Figura I.37; K-W,  $H = 35,33$ ;  $p < 0,05$ ). En los ejemplares recolectados en PMdP, se observó que el IC es significativamente mayor en invierno (Figura I.37; K-W,  $H = 18,46$ ;  $p < 0,05$ ).

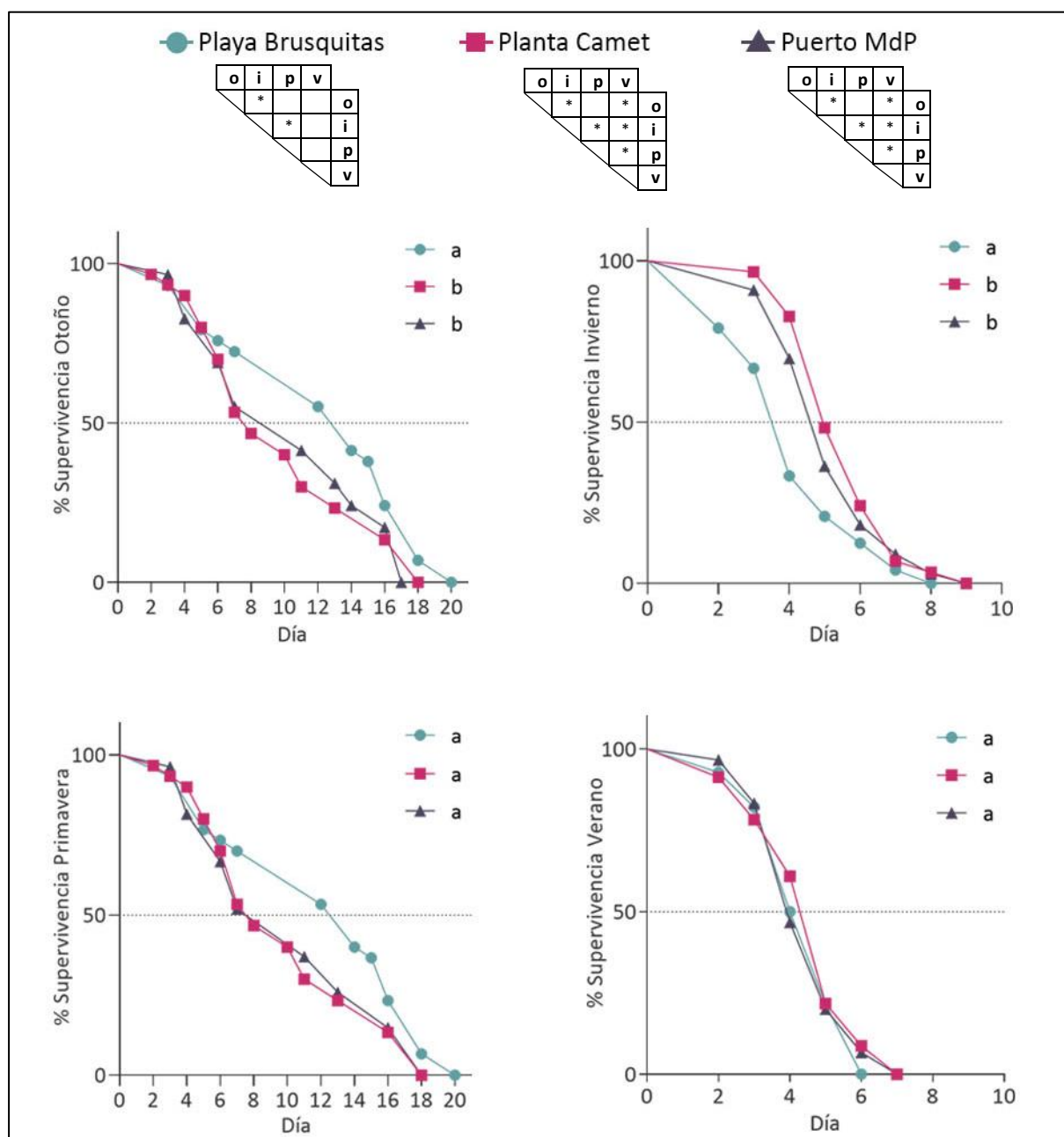


**Figura I.37.** Índice de condición (IC) (media  $\pm$  DE) de los individuos de *Brachidontes rodriguezii* de los distintos sitios y temporadas de estudio. Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios en cada temporada ( $p < 0,05$ ). Las matrices triangulares con asteriscos representan diferencias significativas entre las temporadas para cada sitio ( $p < 0,05$ ). o: Otoño; i: Invierno; p: Primavera; v: Verano.

### Supervivencia al aire

En el ensayo de supervivencia al aire, la variable  $TL_{50}$ , en los ejemplares recolectados en PB se halló entre 4 y 14 días, en PC entre 5 y 8 días, y en PMdP entre 4 y 11 días. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los sitios solamente en las temporadas de otoño e invierno (Figura I.38; prueba de log-rank;  $p < 0,05$ ). En otoño, los ejemplares recolectados en PB presentaron una supervivencia significativamente mayor ( $TL_{50} = 14$  días) que los ejemplares recolectados en PC ( $TL_{50} = 8$ ) y PMdP ( $TL_{50} = 11$  días) (Figura I.38). En invierno, sin embargo, la supervivencia fue menor en los ejemplares recolectados en PB ( $TL_{50} = 4$  días) que en los ejemplares recolectados en PC y PMdP ( $TL_{50} = 5$  días, para ambos sitios) (Figura I.38). Al realizar las comparaciones entre las distintas temporadas para cada sitio, se observaron diferencias significativas en los 3 sitios de estudio (Figura I.38; prueba de log-rank;  $p < 0,05$ ). En los ejemplares recolectados en PB, la supervivencia fue mayor en otoño y primavera ( $TL_{50} = 14$  días) que en invierno y verano ( $TL_{50} = 4$  y 4,5 días, respectivamente). Lo mismo se observó en PC, la supervivencia fue

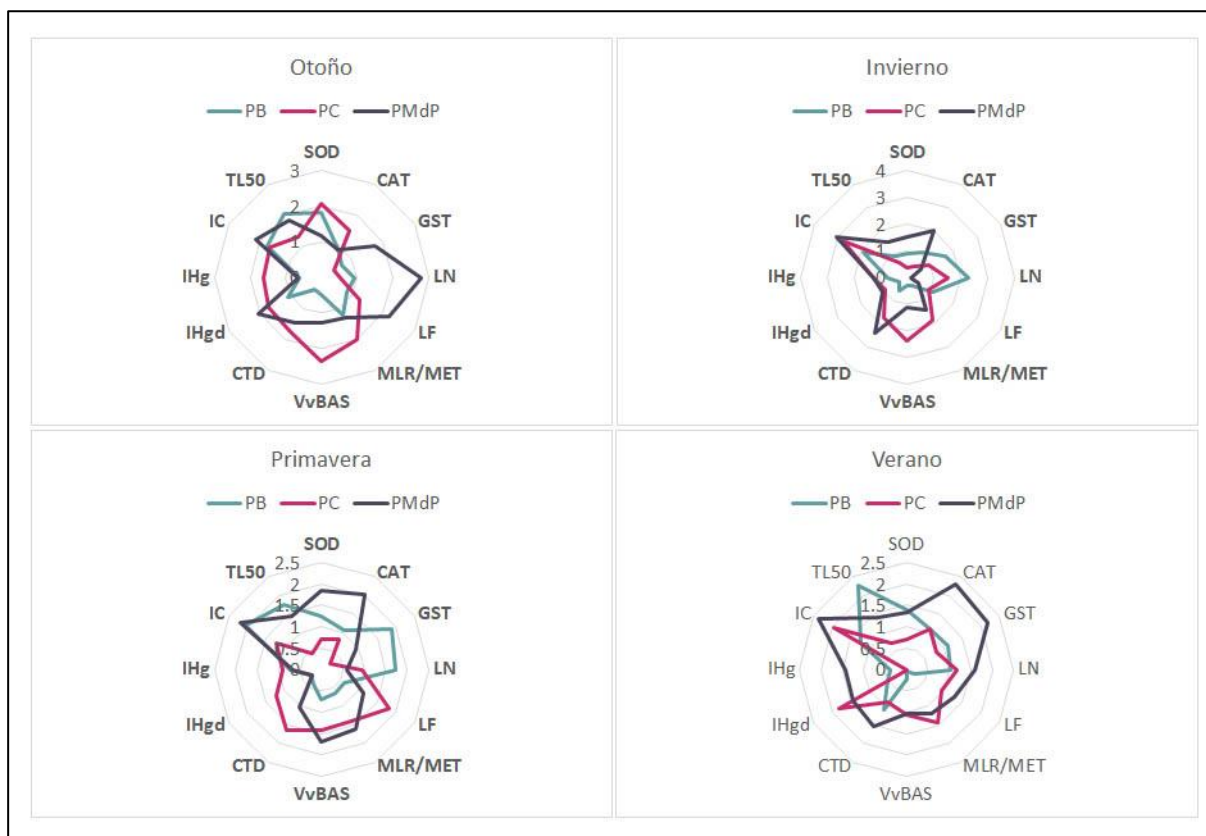
mayor en otoño y primavera ( $TL_{50} = 8$  días, para ambos sitios) que en invierno y verano ( $TL_{50} = 5$  días, para ambos sitios). En los ejemplares recolectados en PMdP se observó la misma tendencia de supervivencia que en los ejemplares de PC, es decir, la supervivencia fue mayor en otoño y primavera ( $TL_{50} = 11$  días) que en invierno ( $TL_{50} = 5$  días) y verano ( $TL_{50} = 4$  días) (Figura I.38).



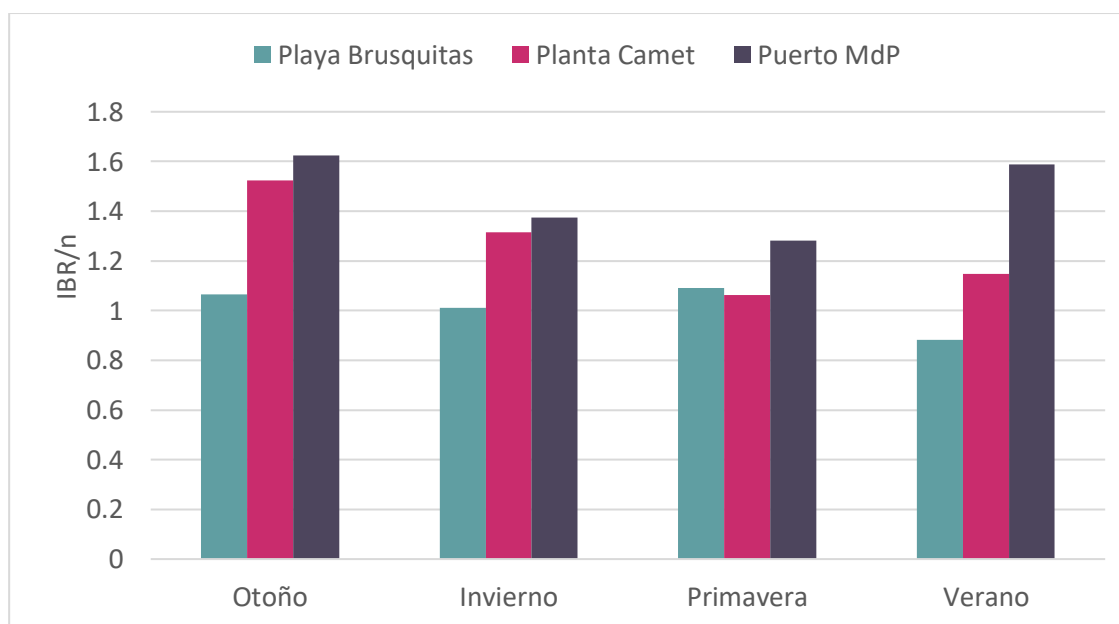
## 2.2.5 Integración de las distintas respuestas biológicas

Los parámetros utilizados para el cálculo del IBR fueron los siguientes: SOD, CAT y GST (nivel bioquímico); LN y LF (nivel celular); MLR/MET, VvBAS, CTD, IHgd e IHg (ambos sin parásitos) (nivel tejido); IC y TL<sub>50</sub> (nivel fisiológico). Estos fueron seleccionados con el fin de representar diferentes niveles de organización biológica y funciones. En la Figura I.39 se representa el grado de contribución de cada parámetro para cada sitio y temporada. En términos generales, en PB se observaron los menores valores de IBR/n (Figura I.40). Las respuestas fisiológicas, IC y TL<sub>50</sub>, junto con SOD, son las que contribuyen mayormente al IBR/n de otoño, LN y TL<sub>50</sub> al IBR/n de invierno, el IC, GST y LN al IBR/n de primavera, y TL<sub>50</sub> al IBR/n de verano. Para PC se observaron valores de IBR/n intermedios, con VvBAS aportando mayormente al cálculo del IBR/n de otoño, y en menor medida SOD y MLR/MET, el IC y VvBAS al de invierno, LF y en menor medida el CTD al de primavera y por último el IC junto con IHgd al de verano. Los mayores valores de IBR/n se observaron para PMdP (Figura I.40) siendo los biomarcadores celulares, LN y LF, los parámetros que más contribuyen al IBR/n de otoño, el IC y CTD al IBR/n de invierno, IC y CAT al IBR/n de primavera, y el IC, CAT y GST al IBR/n de verano.

Al comparar entre temporadas, en PB los valores de IBR/n se mantuvieron relativamente estables a lo largo del año, con el máximo valor en primavera (1,09) y el mínimo en verano (0,88). En PC los valores de IBR/n fueron mayores en otoño (1,52) e invierno (1,31), mientras que en PMdP los mayores valores de IBR/n se observaron en verano (1,59) y otoño (1,62).



**Figura I.39.** Gráficos radiales de las respuestas biológicas estudiada en *Brachidontes rodriguezii* en los diferentes sitios y temporadas. Cada vértice radial representa el grado relativo de cada respuesta. SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; GST: glutatión-S-transferasa; LN: lípidos neutros; LF: lipofuscinas; MLR/MET: radio medio del lumen/altura media del epitelio; VvBAS: densidad del volumen de las células basófilas; CTD: espacio ocupado por el tejido conectivo; IHgd: índice histopatológico de la glándula digestiva; IHg: índice histopatológico del tejido gonadal; IC: índice de condición; TL<sub>50</sub>: tiempo de letalidad media.



**Figura I.40.** Índice de respuestas biológicas (IBR/n) en *Brachidontes rodriguezii* de los distintos sitios y temporadas de estudio.

## 2.3 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se propuso estudiar a la especie *B. rodriguezii* como centinela y bioindicador de contaminación ambiental de áreas costeras en Argentina. Para poder realizar dicho análisis, es imprescindible contar con la información sobre el comportamiento natural de la especie en ambientes con bajo impacto antrópico y entender así, las distintas respuestas biológicas que la especie puede presentar frente a situaciones de estrés ambiental (McCarthy y Shugart, 1990). Debido al tipo de actividades de origen antrópico desarrolladas en el área costera de Mar del Plata, y teniendo en cuenta que los mejillines solo se encuentran sobre sustratos duros, se consideró el área de PB como el sitio de referencia. En los tres sitios de estudio se evaluó la presencia de compuestos orgánicos y metales en sedimento y biota y microplásticos en biota, brindando por primera vez reportes sobre la presencia de estos contaminantes en estos sitios.

Albano y colaboradores (2013) señalan que los sedimentos de sitios que no están contaminados presentan concentraciones de hidrocarburos alifáticos (HAs) por debajo de los 10 µg/g, mientras que Oliva y colaboradores (2015) señalan que los sitios con concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en sedimento menores que 100 ng/g son considerados ambientes de bajos niveles de contaminación. En el presente trabajo, se detectó la presencia de  $\Sigma$ HAs en los sedimentos de todos los sitios y temporadas, pero con valores inferiores al límite previamente mencionado con lo cual podría decirse que ninguno de los sedimentos de estos tres sitios está contaminado por estos compuestos. Por el contrario, los valores de  $\Sigma$ HAPs en sedimentos estuvieron por encima de los 100 ng/g en los tres sitios, sin embargo, los valores de SQG-Q calculados para los  $\Sigma$ HAPs prioritarios nos indican que los sedimentos de los tres sitios estudiados no se encuentran contaminados. En los mejillines recolectados en los tres sitios de estudio, la concentración de hidrocarburos (alifáticos y aromáticos) fue mucho mayor en comparación con estudios previos realizados en la misma especie en otros sitios de la costa bonaerense (Arias et al., 2009; Albano et al., 2013; Oliva et al., 2015, 2017). Sin embargo, si bien en PB se detectó la presencia de hidrocarburos, metales, y microplásticos (MP), en líneas generales sus valores fueron mucho menores que

los observados en PC y PMdP (ver Capítulo 1 de esta Sección). Por este motivo, consideramos apropiada la elección de PB como sitio de referencia para estudiar los niveles basales o respuestas biológicas de *B. rodriguezii* a los efectos de distintos estresores ambientales. Teniendo en cuenta lo discutido en el Capítulo 1 de esta Sección, podemos considerar a PC como un sitio de moderada contaminación debido a la baja concentración de hidrocarburos alifáticos y moderada de hidrocarburos aromáticos policíclicos encontradas en esta especie, aunque la contaminación por MP es alta. La población de PMdP se encuentra altamente contaminada por ambos tipos de compuestos orgánicos y moderadamente contaminada por MP. Ninguno de los sitios se encuentra contaminado por metales.

Los biomarcadores y distintas respuestas fisiológicas frente a la contaminación están estrechamente relacionadas con la biología reproductiva de los organismos (Blanco-Rayón et al., 2020). Los estadios relacionados con ciclo reproductivo de *B. rodriguezii* y la frecuencia de sexos observadas en las poblaciones aquí estudiadas, se corresponden con las descriptas para *B. rodriguezii* en trabajos previos (Torroglosa y Giménez, 2016, 2019). Si bien se encontró un individuo recolectado en invierno en PMdP que presentó características de intersexo, esta baja proporción puede entenderse como la variabilidad natural de la especie (Torroglosa y Giménez, 2019) y de los mitílidos en general (Villalva, 1995; Cáceres-Martínez y Figueras, 1998). El periodo de puesta previamente reportado en Villa Gesell, un sitio de bajo impacto antrópico de la costa bonaerense, correspondió a primavera-verano (Torroglosa y Giménez, 2019). En el periodo aquí estudiado (2018-2019), la reproducción en PB ocurrió de manera similar, en primavera. Allí se observó que machos y hembras se encontraban en sincronía reproductiva y el periodo de puesta principal ocurrió en primavera, lo cual coincidió con el índice gonadal (IG) calculado, que fue el más alto observado en las cuatro temporadas estudiadas. En PC también se observó sincronía entre machos y hembras, aunque en los machos se observaron puestas parciales en las distintas temporadas, mientras que las hembras lo hicieron principalmente en primavera (como en PB) y, en menor medida, en otoño. Por otro lado, en PMdP también se observó sincronía reproductiva entre los sexos, pero con un periodo de puesta prolongado, desde primavera hasta el otoño y no se observó puesta en invierno. Es decir, a pesar de observarse diferencias en la duración de los periodos de puesta,

dentro de cada sitio, las poblaciones de machos y hembras se encontraron en sincronía reproductiva. Este comportamiento de puestas secundarias en *B. rodriguezii* ha sido reportado previamente por Torroglosa y Giménez (2019) quienes registraron machos y hembras maduros sexualmente a lo largo de todo el año en poblaciones de Villa Gesell. Mientras que en PB ocurrió un único y gran evento reproductivo en primavera, similar a lo observado en PC, en PMdP se presentaron varios eventos parciales durante todo el año excepto en invierno. En los mejillones, la gametogénesis está influenciada por factores ambientales, principalmente la temperatura y la disponibilidad de alimento. Dado que entre los sitios no se observaron diferencias en los parámetros físicos analizados dentro de cada temporada, podemos inferir que las diferencias observadas en el desarrollo gonadal y en el índice gametogénico en cada sitio podrían deberse a una diferencia en la disponibilidad de alimento. Otra causa podría ser al estrés generado por la presencia de algún contaminante como los derivados del petróleo que es sabido provocan alteraciones en el desarrollo gonadal (Cajaraville et al., 1992).

El metabolismo aeróbico general produce especies reactivas de oxígeno (ERO) y, en condiciones fisiológicas normales, los animales pueden mantener un equilibrio entre la producción y neutralización de estas sustancias. Se ha observado que en organismos acuáticos, la exposición a distintos contaminantes puede aumentar la producción de ERO y provocar un desbalance en el metabolismo, comúnmente conocido como estrés oxidativo (Lushchak, 2011). En bivalvos, son numerosos los estudios sobre la bioacumulación de metales, compuestos orgánicos y microplásticos en relación con respuestas de estrés oxidativo (Abele et al., 1998; Regoli, 2000; Orbea et al., 2002; Vlahogianni et al., 2007; Ramdine et al., 2012; Vasanthi et al., 2021). Este desbalance puede ser compensado a través de la acción de enzimas detoxificantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) o enzimas de defensa antioxidante como la glutatión S-transferasa (GST) (Di Salvatore et al., 2013). A través del proceso de biotransformación, distintos compuestos o xenobióticos son transformados en sustancias hidrosolubles, menos tóxicas y más fáciles de eliminar por el organismo. Este proceso consta básicamente de dos fases: la fase I que involucra procesos de oxidación, reducción, hidrólisis o hidratación entre otros, y la fase II que consta

principalmente de procesos de conjugación (Timbrell y Marrs, 2011). En la fase I se produce la alteración del xenobiótico original de manera que produce un grupo funcional que puede luego ser conjugado en la fase II o directamente eliminado. Así, por ejemplo, la enzima SOD cataliza la dismutación del radical superóxido (una de las principales ERO) en oxígeno y peróxido de hidrógeno y, CAT degrada el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La fase II consiste en la conjugación de metabolitos con compuestos hidrosolubles endógenos y una de las enzimas más estudiadas es GST, que agrega glutatión a las moléculas y elimina intermediarios que son reactivos.

En Argentina, gran parte de los estudios integrales de contaminación en bivalvos se han focalizado en biomarcadores de respuesta al estrés oxidativo y su relación con la presencia de metales (Giarratano et al., 2010; Duarte et al., 2011; Di Salvatore et al., 2013; Sabatini et al., 2023). Sin embargo, las diferencias en las actividades de las enzimas antioxidantes, o respuestas de daño oxidativo podrían deberse a la presencia de otros contaminantes no evaluados en dichos estudios, pero que habían sido reportados previamente como, por ejemplo, HAPs y PCBs (Commendatore et al., 2000; Commendatore y Esteves, 2007; Massara Paletto et al., 2008).

En distintos estudios que evaluaron la contaminación por metales en bivalvos de Argentina, en líneas generales, la actividad enzimática de SOD se vio aumentada en zonas portuarias (Di Salvatore et al., 2013; Giarratano et al., 2014; Ruiz et al., 2018; Sabatini et al., 2023). Esto no fue lo observado en la población de *B. rodriguezii* de PMdP, posiblemente debido a los bajos niveles de metales encontrados en esta especie. Por otro lado, los hidrocarburos también son conocidos por desencadenar respuestas de estrés oxidativo (Orbea et al., 2002), sin embargo la actividad de SOD observada en la población de PMdP fue similar a la de PB, a pesar de que en PMdP se encontraron concentraciones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos mucho mayores que en PB. Giarratano y colaboradores (2014) al comparar la actividad entre el invierno y el verano en ejemplares de *Aulacomya atra atra* provenientes de sitios con distinto impacto antrópico, observaron que dicha actividad era mayor en invierno. Sin embargo, Viarengo y colaboradores (1991) al analizar las diferencias estacionales de la actividad de SOD en *Mytilus* sp. del hemisferio norte, observaron que ésta

disminuía en otoño-invierno y aumentaba en las temporadas más cálidas coincidiendo con el ciclo reproductivo. Ninguna de estas situaciones fue la observada en *B. rodriguezii* ya que no se encontraron diferencias significativas entre las distintas temporadas estudiadas para cada sitio. El hecho de que no se observe una estacionalidad en la actividad de SOD podría convertirlo en un buen biomarcador, sin embargo, solo se observaron diferencias entre los sitios de estudio en las temporadas cálidas (primavera y verano), sin una tendencia muy clara respecto los niveles de los contaminantes analizados.

A pesar de que las enzimas antioxidantes SOD y CAT guardan una estrecha relación (Xu y Kuppusamy, 2005) dado que el producto de la acción de SOD —peróxido de hidrógeno— es sustrato de CAT, la acción conjunta de estas enzimas no siempre es observada en bivalvos (Giarratano et al., 2011, 2014; Xie et al., 2016). La actividad de CAT en *B. rodriguezii* en los sitios de estudio fue mucho mayor que la observada en los estudios previamente mencionados, pero cabe destacar que estas medidas corresponden al total de masa visceral, a diferencia de los otros trabajos donde se midió diferencialmente la actividad en la glándula digestiva, branquia o manto. La medición en masa visceral total se debió principalmente al pequeño tamaño de *B. rodriguezii* en comparación con otros mitílidos. Estudios realizados en la Bahía de Ushuaia demostraron un aumento en la actividad de CAT en la glándula digestiva de *Mytilus* sp. de sitios contaminados (Giarratano et al., 2010). Esto no fue lo observado en *B. rodriguezii*, donde la actividad de CAT no presentó diferencias significativas entre los distintos sitios de estudio ni relación con los niveles de contaminantes encontrados, similar a lo observado en *A. atra atra* (Giarratano et al., 2014) y *Mytilus edulis chilensis* (Giarratano et al., 2011). Duarte y colaboradores (2011) observaron que la actividad de CAT medida en la glándula digestiva y branquias de *M. edulis chilensis* fue mayor en el sitio de referencia con respecto a otros sitios impactados en coincidencia con el periodo de puesta de la especie. En este estudio, En PB y PC, se observó la mayor actividad de CAT durante el verano y el otoño y los menores valores durante el invierno y la primavera. Estas variaciones podrían estar relacionadas con el ciclo reproductivo, en donde los mayores valores de CAT corresponderían al periodo de restauración de reservas y gametogénesis. En conclusión, al no ser posible distinguir diferencias entre los sitios dentro de cada temporada,

este biomarcador no sería de gran utilidad en la evaluación de la respuesta de estrés oxidativo frente a la contaminación en *B. rodriguezii*. La actividad de esta enzima podría estar reflejando la peroxidación lipídica relacionada con el ciclo reproductivo más que al sistema antioxidante frente a la contaminación.

La respuesta de los biomarcadores no solo depende del nivel de exposición al contaminante, sino también de cuánto tiempo después de esta exposición ese biomarcador es evaluado y si ocurre un proceso de reparación eficiente en la especie (Duarte et al., 2011). Es por ello que hay que poner especial atención en los estudios realizados con especies nativas, como lo es *B. rodriguezii*. Estas especies presentan bajos niveles de respuesta en los biomarcadores ya que estarían aclimatadas a las condiciones ambientales que habitan, por lo que los niveles de toxicidad a los que están expuestas podrían no ser lo suficientemente altos como para provocar una respuesta (Cancio et al., 1997; Duarte et al., 2011).

Por último, en relación con las respuestas bioquímicas, se evaluó la actividad de la enzima de biotransformación de fase II GST. Esta enzima también ha mostrado una respuesta diferencial tejido-específica aunque el rango de valores aquí observado fue similar al de trabajos previos en distintos tejidos (Duarte et al., 2011; Di Salvatore et al., 2013; Giarratano et al., 2014; Ruiz et al., 2018; Sabatini et al., 2023). Esta enzima ha presentado variaciones entre temporadas dependiendo del tejido estudiado y la especie de mitílido (Sabatini et al., 2023). Por ejemplo, en el mitílido *A. atra atra* se ha observado una mayor actividad de GST en temporadas frías (Giarratano et al., 2014) mientras que la actividad medida en las branquias de *M. edulis* ha sido mayor en temporadas cálidas (Duarte et al., 2011; Giarratano et al., 2011). Asimismo, la actividad de GST medida en la masa visceral de *B. rodriguezii*, fue mayor en la temporada de verano en los tres sitios de estudio, coincidiendo con la mayor actividad de CAT. Esto ha sido reportado en otras especies como una respuesta a corto plazo al aumento estacional de las EROs (Regoli, 2004; Duarte et al., 2011). Sin embargo, la única temporada en la que se observaron diferencias significativas entre los sitios, fue la primavera. En esa temporada la actividad de GST fue mayor en PMdP, en concordancia con los altos valores de hidrocarburos (alifáticos y aromáticos). Laitano y Fernández-Gimenez (2011) también encontraron altos valores de GST en *B. rodriguezii* del puerto de Mar del Plata, al

compararlo con otros sitios menos contaminados. Puede decirse entonces que, si bien la actividad de GST depende del ciclo reproductivo de esta especie, las variaciones se mantienen entre los sitios, por lo que sería un buen biomarcador de respuesta de detoxificante frente a la presencia de contaminantes como los hidrocarburos.

A la fecha, los únicos biomarcadores bioquímicos estudiados en *B. rodriguezii* en relación con la contaminación habían sido la actividad de enzimas inmunológicas como las fenoloxidasas y peroxidasas, y la enzima de biotransformación GST, habiéndose observado diferencias únicamente en esta última (Laitano y Fernández-Gimenez, 2016). En el presente trabajo se amplió el conocimiento sobre la sensibilidad de este biomarcador y sus variaciones estacionales y se postula a esta última enzima como una buena opción en estudios integrales de contaminación. Instamos a la comunidad científica a unificar criterios sobre la elección del tejido en la medición de la actividad de distintas enzimas en mitílidos para que los resultados y sus variaciones puedan ser comparables en los estudios de biomonitorio de Argentina y la región sudamericana.

La glándula digestiva de los bivalvos, además de ser la principal reserva energética, es centro de detoxificación y eliminación de distintos xenobióticos (Faggio et al., 2018). Distintos productos de la peroxidación lipídica o el sistema lisosomal, como los lípidos neutros (LN) y las lipofuscinas (LF), pueden acumularse en las células de la glándula digestiva y ser utilizados como biomarcadores de respuesta general a la contaminación o de situaciones de estrés (Viarengo et al., 1991; Kagle et al., 2003; Marigómez y Baybay-Villacorta, 2003; Au, 2004). Por otro lado, una de las principales reservas energéticas encontradas en la glándula digestiva son los LN (Koukouzika et al., 2009). Estas reservas son transferidas a la gónada durante la gametogénesis o en situaciones de estrés (Rodríguez-Moscoso y Arnaiz, 1998; Gómez-Robles et al., 2009). En PB la alta acumulación de LN observada durante la primavera coincidió con la mayor proporción de ejemplares en el estadio de maduración y disminuyó en el período de post-puesta (verano), como fue observado en el mitílido *Mytilus galloprovincialis* en otras regiones (Regoli, 1992; Domouhtsidou y Dimitriadis, 2001). También, al estudiar el índice histopatológico en la gónada, pese a no encontrarse diferencias significativas entre temporadas, se observó el mayor valor durante el periodo de post-puesta. Las alteraciones

histológicas más frecuentes fueron la presencia de células pigmentadas en los acinos y la atresia de los oocitos, ambos indicadores de los procesos de autólisis y reabsorción de las gametas remanentes, característicos de este periodo de estrés después de la maduración de las gametas (Smolarz et al., 2017). En el caso de la población presente en PC, si bien la puesta también ocurrió en primavera, no se observaron diferencias en la acumulación intracelular de LN en la glándula digestiva entre esta temporada y el verano, además los valores son significativamente menores que los observados en PB. Esto podría deberse a que los mejillines de esta población no poseen las reservas energéticas suficientes para lograr la evacuación total de las gametas, lo que podría inducir el segundo evento de evacuación parcial durante el otoño y por eso la acumulación de LN es mínima en esa temporada. Contrariamente a lo sucedido en PB y PC, en la población de PMdP la mínima acumulación de LN se observó en invierno, luego de las puestas de primavera, verano y otoño. Esta reducción en el contenido de LN en las poblaciones de PC y PMdP podría estar relacionada con la energía invertida en la reproducción, lo que reduciría la energía disponible para procesos de detoxificación (Kagley et al., 2003). Existen numerosos trabajos en mitílidos que reportan el aumento en la acumulación intracelular de LN en respuesta a la presencia de compuestos orgánicos (Moore, 1988; Marigómez y Baybay-Villacorta, 2003; Garmendia et al., 2010; Brooks et al., 2011; Marigómez et al., 2013a) ya que debido a su lipofilia, pueden alterar el metabolismo lipídico y provocar su acumulación dentro de los lisosomas (Petrović et al., 2004). Sin embargo, también se ha reportado que los efectos de la contaminación podrían verse enmascarados por cierta estacionalidad de este biomarcador en moluscos (Cancio et al., 1999; Guerlet et al., 2006). Dado que en la población de PMdP se encontraron altas concentraciones de hidrocarburos, se esperaría que en este sitio la acumulación de LN fuera mayor, sin embargo, esto no fue lo observado. Además, si se analiza la acumulación de LN a lo largo de las temporadas, no hay un patrón claro respecto a la acumulación de  $\Sigma$ HAPs prioritarios en la masa visceral, como fue observado en otros estudios (Marigómez y Baybay-Villacorta, 2003; Aarab et al., 2011). Koukouzika y colaboradores, al evaluar el patrón estacional de LN acumulados en la glándula digestiva de *M. galloprovincialis*, observaron ausencia de LN e inactividad del sistema lisosomal durante el invierno boreal (Koukouzika

et al., 2009). Los autores señalaron que ello podría deberse al estrés generado por las condiciones desfavorables de esa temporada y por lo tanto dicho biomarcador no sería lo suficientemente sensible como para revelar el estrés producido por la presencia de contaminantes. En este estudio, la acumulación de LN en los mejillines estaría influenciada por la estacionalidad y no sería un biomarcador recomendado en esta especie.

Las LF, como se mencionó, son el producto final de la peroxidación lipídica, pero además su acumulación ha sido relacionada con el daño oxidativo, la detoxificación de metales y HAP y los daños en la función digestiva de la glándula digestiva (Viarengo et al., 1990; Regoli, 1992; Aarab et al., 2008, 2011; Benito et al., 2017). En la población de PMdP, durante el otoño se observaron valores de LF significativamente más altos que en el resto de las temporadas, en coincidencia con los valores máximos de HAP detectados para el sitio. Sin embargo, en el resto de las temporadas, las LF fueron menores en PMdP que en los otros sitios. En la población de PB si bien se encontraron valores de Cd por encima del límite máximo para consumo humano, tampoco se observaron valores de LF significativamente más altos que en el resto de los sitios, a excepción de la temporada de invierno que coincide con la temporada con mayor presencia de metales (Cd, Cr, Ni y Zn). Esto también fue observado en *M. galloprovincialis* expuestos a metales (Viarengo y Nott, 1993; Moschino et al., 2016). Pese a ello, un estudio experimental realizado en *M. galloprovincialis* ha reportado que el Cd y el Zn —dos de los metales más abundantes registrados en *B. rodriguezii* en el presente trabajo— no afectan el contenido de LF y además el Cu, un metal no analizado en el presente trabajo, estimula la peroxidación lipídica en los mejillones (Viarengo et al., 1990). Asimismo, Regoli (1992) observó un aumento en la acumulación de LF en *M. galloprovincialis* en relación a la bioacumulación de metales como el Cu, Fe, Mn, Pb y Zn. En resumen, la relación entre la acumulación intracelular de LF y las concentraciones de contaminantes metálicos y orgánicos en los mejillines no presentaron un patrón claro. Al igual que la acumulación intracelular de LN, este biomarcador podría estar influenciado por el ciclo reproductivo (Petrović et al., 2004) y sus variaciones estacionales debido a procesos fisiológicos que podrían enmascarar su respuesta a la contaminación.

Contrariamente a lo observado histoquímicamente, al analizar los cortes histológicos, se observó una mayor prevalencia de agregados simil-lipofuscinas en las células de la glándula digestiva de las poblaciones de PC y PMdP en las temporadas de otoño y verano. Esto también fue observado en estudio realizado en *B. rodriguezii* en la zona del puerto de Mar del Plata (Arrighetti et al., 2019). Si bien el análisis histológico de agregados simil-lipofuscinas presenta una metodología sencilla y rápida, podría sobrestimar la presencia de lipofuscinas; mientras que el análisis histoquímico, metodológicamente, es un poco más laborioso, pero brinda información precisa sobre la abundancia de lipofuscinas. Se recomienda tener en cuenta estas consideraciones al utilizar estos biomarcadores y, en la medida de lo posible, priorizar la utilización del análisis histoquímico y la cuantificación de LF.

Las concentraciones de metales biodisponibles en el sedimento de los sitios de estudio difirieron de las concentraciones observadas en los mejillines. Estos podrían estar incorporando los metales a través de procesos de filtración de la columna de agua o la dieta. Además, las concentraciones de metales en masa visceral de moluscos, pueden ser alteradas por diversas variables naturales (Soto y Marigómez, 1997). Así, han surgido otras alternativas para evaluar la presencia de metales en mitílidos, como la cuantificación de depósitos metálicos utilizando técnicas autometalográficas. Estas técnicas revelan histoquímicamente la presencia de iones metálicos en la glándula digestiva o branquias que se pueden observar y cuantificar mediante la acumulación de depósitos negros de plata (BSD, por sus siglas en inglés) (Danscher, 1984; Soto y Marigómez, 1997a 1997b; Raftopoulou et al., 2003). En *M. galloprovincialis* se ha aplicado esta técnica para cuantificar la presencia de depósitos metálicos intralisosomales en las células digestivas tanto en estudios de laboratorio (Jimeno-Romero et al., 2017; Duroudier et al., 2019a, 2021) como en trabajos de campo (de los Ríos et al., 2013, 2016b, 2018). En el presente trabajo, se utilizaron como controles positivos cortes de mejillones *M. galloprovincialis* expuestos a 750 µg/L de Ag, y sus respectivos controles no expuestos. El *kit* autometalográfico demostró ser eficaz y sensible en estos cortes, pero no así en los cortes de los ejemplares de *B. rodriguezii* provenientes de los sitios de estudio; por lo tanto, la cuantificación de los BSD no pudo realizarse. Es posible que esto se deba a que las concentraciones de metales registradas en *B. rodriguezii* fueron mucho menores a las

analizadas en estudios previos que utilizaron técnicas autometalográficas con muestras ambientales (de los Ríos et al., 2013, 2016b, 2018). Si bien la técnica ha demostrado ser de gran utilidad, no sería lo suficientemente sensible para evaluar muestras ambientales de sitios donde solo se detectan algunos metales o en cantidades que no son muy elevadas.

En los organismos acuáticos, y particularmente en los bivalvos, la evaluación de distintas histopatologías ha probado ser una herramienta sencilla y sensible para la determinación de alteraciones relacionadas a distintos contaminantes (Bignell et al., 2012). La glándula digestiva de los bivalvos es un órgano que presenta cierta plasticidad, por ejemplo, la morfología de los túbulos digestivos atraviesa distintos cambios acordes a los procesos y fases de digestión que atraviesa (Langton, 1975). Sin embargo, también ha sido demostrado que la exposición a distintos xenobióticos puede reflejarse en una pérdida de masa o adelgazamiento del epitelio de los túbulos en moluscos (Lowe et al., 1981; Cajaraville et al., 1992, 1993; Garmendia et al., 2011). Esta alteración, conocida como atrofia de los túbulos digestivos, puede evaluarse cualitativamente y también cuantitativamente a través de parámetros como la relación MLR/MET y MET/MDR. Altos valores de la relación MLR/MET y bajos valores de MET/MDR son indicadores de atrofia de los túbulos digestivos (Garmendia et al., 2010; Brooks et al., 2011). También, frente a situaciones de estrés ambiental y la presencia de contaminantes, pueden observarse cambios en los distintos tipos celulares en el epitelio. En condiciones fisiológicas normales, el epitelio de los túbulos digestivos está compuesto por dos tipos celulares: las células digestivas y las células basófilas, siendo las primeras las más abundantes. En condiciones de estrés, ocurre una pérdida de células digestivas y una hiperplasia (aumento en número) de las células basófilas (Marigómez et al., 1998; Zaldibar et al., 2007a; Brooks et al., 2012; Blanco-Rayón et al., 2019). Dicha hiperplasia es reversible y puede cuantificarse a través de la densidad en volumen de las células basófilas (VvBAS). De manera complementaria, la pérdida del tejido digestivo puede evaluarse midiendo la proporción entre tejido conectivo y digestivo (CTD, por sus siglas en inglés) (Brooks et al., 2011; Marigómez et al., 2017). En PB, no se observaron variaciones temporales en las relaciones MLR/MET y MET/MDR y VvBAS pero si hubo diferencias en la relación CTD con bajos valores en comparación con los sitios impactados. En PC y en PMdP, tampoco se

observaron variaciones temporales para ninguno de los parámetros. Según estos valores, la glándula digestiva de los ejemplares recolectados en PC y PMdP presentan atrofia en los túbulos, mayor proporción de células digestivas y un aumento en el tejido conectivo, lo que coincide con las observaciones realizadas para el cálculo del índice histopatológico. Estas alteraciones pueden afectar los procesos digestivos y el metabolismo y acumulación de los xenobióticos (Marigómez et al., 1998). Además, se observaron otras alteraciones como hipertrofia de las células digestivas, infiltración hemocítica, la presencia de granulocitomas, necrosis y fibrosis. Estos resultados nos sugieren que las poblaciones de mejillín de PC y PMdP están bajo algún grado de estrés. En PMdP podrían estar asociados a los altos niveles de hidrocarburos, como ya ha sido reportado para otras especies, (Cajaraville et al., 1992; Marigómez et al., 2006; Brooks et al., 2011, 2012; Garmendia et al., 2011b), mientras que en PC podría estar relacionado a la alta acumulación de microplásticos que se ha demostrado que pueden encontrarse en los túbulos digestivos (Paul-Pont et al., 2016). Además, la ingestión de MP puede facilitar el transporte de contaminantes a los organismos, fenómeno conocido como “efecto troyano o de caballo de Troya” (Browne et al., 2013; Cole y Galloway, 2015; Lusher, 2015; Guo y Wang, 2019; Vivekanand et al., 2021). Estos compuestos químicos pueden ser los añadidos a los plásticos durante su fabricación o los compuestos orgánicos persistentes que están en el agua y son adsorbidos a las partículas de MP (Lozoya et al., 2016).

Los valores de MLR/MET, MET/MDR y VvBAS también fueron mayores en *B. rodriguezii* del puerto de Mar del Plata al compararlo con un sitio de bajo impacto antrópico en Villa Gesell (Arrighetti et al., 2019), aunque estos autores no encontraron diferencias en los valores de CTD. Sin embargo, la relación CTD utilizada de manera complementaria con los parámetros MLR/MET, MET/MDR y VvBAS, podría brindar información útil en la interpretación general de los cambios histológicos producidos en el tejido de la glándula digestiva. Si bien los valores de MLR/MET, MET/MDR y VvBAS calculados en este trabajo fueron similares a los previamente reportados para esta especie (Arrighetti et al., 2019), fueron superiores a los usualmente reportados como valores base en *M. galloprovincialis* por ICES (Bignell et al., 2012). Las diferencias observadas podrían deberse a las diferencias de tamaño

entre las dos especies, incluso se han observado diferencias en el intervalo de valores de VvBAS en especies cercanas como *M. galloprovincialis* y *M. edulis* (Brooks et al., 2011). Otra de las causas de las diferencias en los valores de estos parámetros podría ser la metodología empleada. En los estudios de *B. rodriguezii* se utilizó el programa AxioVision para el análisis de imágenes y la evaluación de MLR/MET, MET/MDR y el programa STEPanizer1 para el VvBAS y CTD, mientras que los trabajos previos de *Mytilus* spp. se han realizado utilizando una cámara clara y sistemas reticulares de Weibel (Weibel, 1979). Si bien las guías de ICES sugirieron estas metodologías hace años, también indicaron que el análisis podía hacerse con la ayuda de cualquier programa analizador de imágenes (Bignell et al., 2012). El programa AxioVision es de libre acceso y permite análisis de imágenes de manera rápida y sencilla y el programa STEPanizer1 ha sido diseñado por el propio Weibel con el fin de brindar una herramienta accesible y de fácil uso (Tschanz et al., 2011). Sería entonces necesaria una revisión y actualización de los valores base de los parámetros MLR/MET, VvBAS, CTD (y similares) para *Mytilus* spp aplicando nuevas tecnologías. Por todo lo previamente mencionado, los valores aquí reportados para estos biomarcadores podrían considerarse como niveles guía para *B. rodriguezii*. Además, se incluye en el Anexo de esta tesis la metodología detallada paso a paso para que en futuros trabajos en esta especie se puedan realizar los análisis utilizando los programas mencionados y que los resultados sean comparables. Se puede concluir que, al no haber variaciones de estos parámetros en los sitios impactados a lo largo de las temporadas, podemos considerar estos biomarcadores de gran utilidad para evaluar los efectos de la contaminación en *B. rodriguezii*, usando de valores basales lo obtenido en PB. Para su implementación se sugiere limitar el monitoreo a temporada de invierno que es donde se observaron, para los cuatro parámetros, diferencias entre los sitios.

Respecto al análisis histológico, en el tejido gonadal también se observaron histopatologías como la infiltración hemocítica, atresia oocitaria en hembras, la presencia de células pigmentadas y agregados simil-lipofuscinas. La presencia de granulocitomas, fibrosis o necrosis fueron observadas en unos pocos ejemplares. Tanto en la glándula digestiva como en la gónada se observó que la prevalencia acumulada de las distintas alteraciones fue menor

en PB, seguido por PC y PMdP. Este análisis puede brindar más información si se incluye el uso de un índice histopatológico (IH) de cada órgano (Costa et al., 2013; Cuevas et al., 2015). Estos índices nos permiten integrar todas las alteraciones en un único valor con el fin de facilitar la interpretación entre sitios y temporadas (Cuevas, et al., 2015). En PB, se observaron los menores valores de IH para ambos órganos, confirmando en líneas generales la sensibilidad del análisis histopatológico como un indicador de estrés general. En PMdP, la prevalencia acumulada de histopatologías y el IH en la glándula digestiva fueron más altos durante el invierno, donde la acumulación de LN en las células digestivas es la más baja. Estos daños y el bajo contenido energético podría ser consecuencia del periodo de evacuación extendido de esta población. Además, las hembras presentan atresia durante todo el año, lo que podría derivar en una menor cantidad de oocitos viables generando una deficiencia en la reproducción. En PC, también se observó atresia en los oocitos, sin embargo, la prevalencia acumulada de las distintas histopatologías en el tejido gonadal y el IH son menores que en PMdP. En primavera, el IH en la glándula digestiva es mayor que en el resto de los sitios, posiblemente asociado a la presencia de MP.

Uno de los principales inconvenientes en los estudios de biomonitoreo es la presencia de posibles factores de confusión que pueden conducir a una mala interpretación de los resultados (Garmendia et al., 2010; Costa et al., 2013; Cuevas et al., 2015), por ejemplo, la parasitosis. La mayoría de los estudios de parásitos en bivalvos en Argentina se han focalizado en especies de interés comercial (Vázquez y Cremonte, 2017; Vázquez et al., 2020), mientras que son escasos los reportes en *B. rodriguezii* (Arrighetti et al., 2019; Ojeda et al., 2021). Tanto en la glándula digestiva como en el tejido gonadal de los mejillines de PB y PC, se observó un único tipo de parásitos, los trematodos digeneos que podrían pertenecer a la familia Bucephalidae. Estos parásitos suelen infectar el tejido gonadal de los bivalvos pero cuando la intensidad de la infección es muy alta, los esporocistos pueden también alojarse en otros órganos, como la glándula digestiva o las branquias (Bignell et al., 2008; Cremonte, 2011). Los ejemplares de PB y PC podrían ser más susceptibles a la parasitosis debido a una mejor condición del estado de salud, lo cual podría ser la causa de ausencia de parásitos en los mejillines de PMdP (otra explicación plausible sería que la elevada contaminación en

PMdP impida la supervivencia de los parásitos en los mejillones). Esto también fue observado en *M. galloprovincialis* colectados en zonas contaminadas y no contaminadas de la Bahía de Vizcaya (Cuevas et al., 2015). Sin embargo, en ocasiones la alta intensidad de infección produjo castración en los mejillines registrándose un 11 % de ejemplares castrados en PB y un 15 % en PC. Si bien la presencia de bucefálidos no tendría una consecuencia inmediata en la mortalidad de *B. rodriguezii*, podría tener efectos adversos en el potencial reproductivo de las poblaciones (Ojeda et al., 2021). Por este motivo, el IH fue calculado con y sin la parasitosis. Al no incluir la parasitosis en el IH, los valores de ambos índices fueron menores, pero la tendencia observada fue la misma. Esto debería considerarse en estudios futuros, y contemplar en el análisis el efecto particular que podría causar cada tipo de parásitos, ya que es crucial para la interpretación de los resultados.

Con respecto las respuestas fisiológicas, al ensayo de supervivencia al aire o de estrés al estrés (SOS, por sus siglas en inglés) y el índice de condición (IC) son métodos simples, de bajo costo y que brindan información a nivel del organismo y las alteraciones que este puede sufrir debido a la presencia de contaminantes y, el IC en particular, en relación con distintos procesos como el crecimiento o la reproducción (Pampanin et al., 2005; Martínez-Gómez y Thain, 2012; Blaise et al., 2017). Es sabido que los mitílidos que se encuentran en situaciones de estrés ambiental por la presencia de contaminantes, mueren más rápidamente durante la anaerobiosis (Viarengo et al., 1995; Blaise et al., 2017). Esto supone que en los sitios contaminados, existe un compromiso entre la distribución de la energía utilizada en los distintos procesos metabólicos y en procesos de detoxificación (Petrović et al., 2004). Por ejemplo, se ha observado una reducción de la supervivencia al aire en poblaciones de *M. galloprovincialis* de zonas cercanas a plantas de tratamientos de aguas residuales o zonas portuarias (de los Ríos et al., 2013, 2016b). En el presente trabajo, en los tres sitios de estudio se observó que la supervivencia fue mayor en las temporadas de temperaturas menos extremas (otoño y primavera) que en las de temperaturas más extremas (invierno y verano); de hecho, en PMdP, la menor supervivencia se observó durante el verano, al igual que en *M. galloprovincialis* del mar Adriático (Petrović et al., 2004). Particularmente, en *B. rodriguezii*, se ha observado que la exposición a altas temperaturas disminuye el tiempo de supervivencia

al aire en poblaciones de zonas portuarias (Díaz-Jaramillo et al., 2020). En PB si bien se observaron diferencias entre la supervivencia de otoño e invierno, el IC se mantuvo estable durante todas las temporadas. Durante el otoño se observaron los menores valores de supervivencia en PC y PMdP, coincidiendo con los bajos valores en el IC. Lo contrario sucede en invierno, altos valores de supervivencia y altos valores en el IC, lo que refleja una mejor condición fisiológica a pesar de los niveles de contaminación por hidrocarburos y MP. Se observó, en todas las temporadas, que el IC en los mejillines de PMdP fue menor que los de PB y PC. En la población de *B. rodriguezii* del estuario de Bahía Blanca (Argentina), al estudiar la relación entre el IC y la bioacumulación de HAPs, se concluyó que las diferencias observadas estarían relacionadas con factores como el ciclo reproductivo de la especie y no con la contaminación (Oliva et al., 2017). Por otro lado, también se observó en el mismo sitio que el IC era inversamente proporcional a la concentración de metales en masa visceral (Buzzi et al., 2017; Buzzi y Marcovecchio, 2018). Dado que en PMdP se observaron puestas parciales a lo largo del año, esta podría ser una causa de la disminución del IC en estas poblaciones. Otra causa podría ser la presencia de altas concentraciones de hidrocarburos que podrían generar un deterioro en la calidad ambiental (Marigómez et al., 2006). Por otro lado, el mayor IC de los mejillines de PC con respecto a los de PB, podría deberse a que, debido a la presencia de la planta de tratamiento de aguas residuales en PC, los mejillines están expuestos a una mayor disponibilidad de nutrientes, como fue reportado en otros trabajos (Damien et al., 2007; Benali et al., 2015). Esto coincide con la mayor cantidad de materia orgánica encontrada en los sedimentos en este sitio. Esto nos indica que los biomarcadores de estrés a nivel de organismo, como la supervivencia al aire y el IC, son muy sensibles al estado nutricional de los mejillines, por lo que una alta disponibilidad de alimento puede enmascarar los efectos negativos de la contaminación.

La supervivencia al aire y el IC serían respuestas fisiológicas valiosas del estado de salud general de los organismos, pero su implementación debería limitarse a temporadas que no incluyan los periodos de puesta de gametas ni de alta disponibilidad de alimento. En el caso de *B. rodriguezii*, la temporada ideal para su utilización sería entonces la temporada de invierno.

Finalmente, los biomarcadores y respuestas fisiológicas fueron integrados a partir del índice integral de respuesta biológica (IBR/n), que permite combinar las distintas respuestas biológicas en un único valor y facilitar la interpretación de los resultados (Broeg y Lehtonen, 2006). El uso del índice IBR/n permitió distinguir los niveles de estrés entre sitios, y claramente en PMdP se observaron los valores máximos. En PB, si se lo compara con el resto de los sitios, se observaron los menores valores de IBR/n. El valor más alto de IBR/n se observó en primavera coincidiendo con el mayor periodo de estrés relacionado al periodo de liberación de gametas. En PC, los valores de IBR/n fueron intermedios, con los valores más altos en las temporadas de otoño e invierno, situación que no coincidió con los dos periodos de puesta observados (primavera-verano). Podría suceder que en este caso la reproducción no estuviera relacionada y que los valores de estrés integrados sean altos porque son otros los factores que aumentan las respuestas, como la alta acumulación de MP observada en este sitio o en menor medida la presencia de HAPs. El IBR más alto de todo el estudio fue observado en PMdP durante el otoño coincidiendo con las máximas concentraciones de HAPs. Además, se registraron valores altos en verano, situación que no coincide con los tres periodos parciales de puesta de gametas (primavera, verano y otoño).

Con este trabajo se pudo comprobar la importancia de realizar estudios multidisciplinarios que combinen las mediciones químicas en los sedimentos, su bioacumulación en el mejillín y las distintas respuestas biológicas. De esta forma se podrían establecer protocolos de monitoreo en ambientes complejos y heterogéneos como son los puertos o las zonas cercanas a las descargas de efluentes. Además, con estos resultados se pudo establecer las líneas de base de respuestas biológicas antes de su uso en programas de monitoreo.

**SECCIÓN II. Enfoque ambiental integrado para evaluar los  
efectos biológicos en el mitílido *Mytilus galloprovincialis*  
Lamarck, 1819 en dos localidades del Golfo de Vizcaya, País  
Vasco (España)**

## II.I OBJETIVO

Determinar los potenciales efectos biológicos en el mitílido *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 recolectado en dos ambientes costeros del Golfo de Vizcaya (España) con distintos tipos de impacto antrópico.

## II.II OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS ASOCIADAS

- Objetivo: Determinar la disponibilidad de diferentes contaminantes en sedimento proveniente de dos ambientes con distintos tipos de impacto antrópico y su relación con la bioacumulación en el mitílido *M. galloprovincialis*.

Hipótesis: Los sitios de estudio presentan diferentes contaminantes que pueden bioacumularse en *M. galloprovincialis*.
- Objetivo: Estudiar la respuesta de biomarcadores bioquímicos y de genotoxicidad en el mitílido *M. galloprovincialis* en dos ambientes con distintos tipos de impacto antrópico.

Hipótesis: Los distintos tipos de impacto de origen antrópico generan respuestas en biomarcadores bioquímicos y de genotoxicidad en *M. galloprovincialis*.
- Objetivo: Estudiar la respuesta de distintos biomarcadores celulares y tisulares en el mitílido *M. galloprovincialis* en dos ambientes con distintos tipos de impacto antrópico.

Hipótesis: Los distintos tipos de impacto de origen antrópico generan respuestas de biomarcadores celulares y tisulares en *M. galloprovincialis*.
- Objetivo: Estudiar distintas respuestas fisiológicas en el mitílido *M. galloprovincialis* en dos ambientes con distintos tipos de impacto antrópico.

Hipótesis: Los distintos tipos de impacto de origen antrópico generan respuestas fisiológicas en *M. galloprovincialis*.

5. Objetivo: Establecer cuáles son las respuestas biológicas más apropiadas en el mitílido *M. galloprovincialis* para evaluar el estado de cada ambiente estudiado.

Hipótesis: El uso de un índice integral de respuesta de biomarcadores permite establecer cuáles son los ambientes con mayor impacto antrópico.

El objetivo específico 1 se desarrolla en el Capítulo 1, mientras que el resto de los objetivos específicos se desarrollan en el Capítulo 2. Finalmente, ambos capítulos se integran en las Conclusiones.

## II.III INTRODUCCIÓN GENERAL

### El mitílido *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819

#### Ecología de la especie, hábitat y distribución

El mitílido *M. galloprovincialis* pertenece al "Complejo *Mytilus*", que agrupa tres especies del género *Mytilus*: *M. edulis* Linné, 1758, *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819 y *M. trossulus* Gould, 1850 (McDonald et al., 1991). La clasificación sistemática vigente de este bivalvo es la siguiente:

Filo: MOLLUSCA

Clase: Bivalvia

Subclase: Autobranchia

Infraclase: Pteriomorpha

Orden: Mytilida

Superfamilia: Mytiloidea

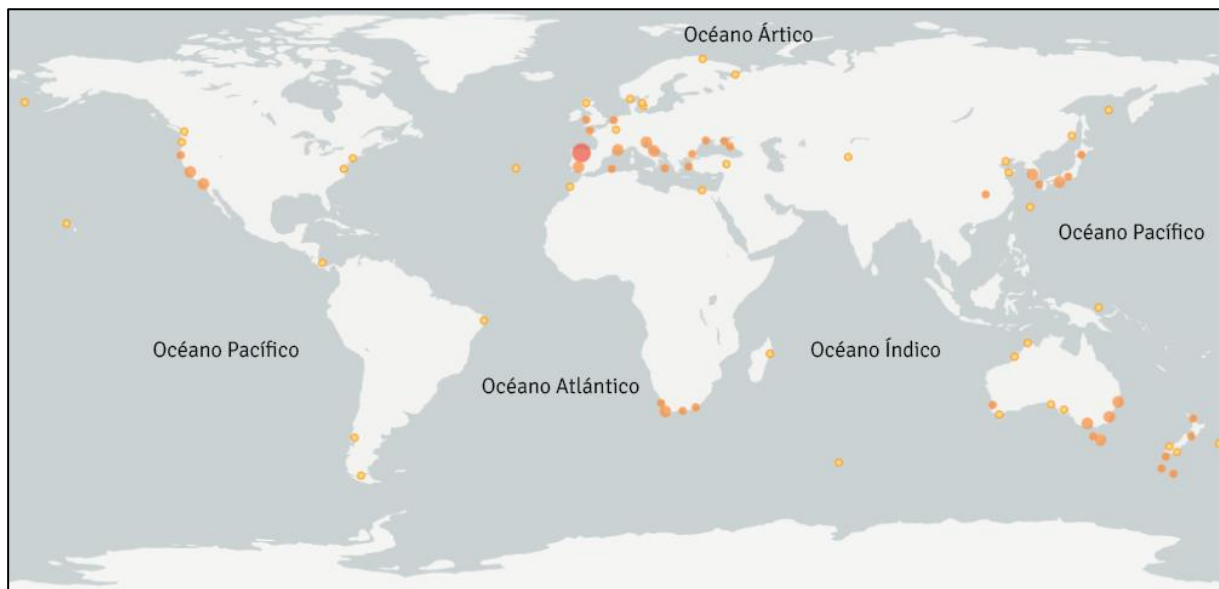
Familia: Mytilidae

Subfamilia: Mytilinae

Género: *Mytilus*

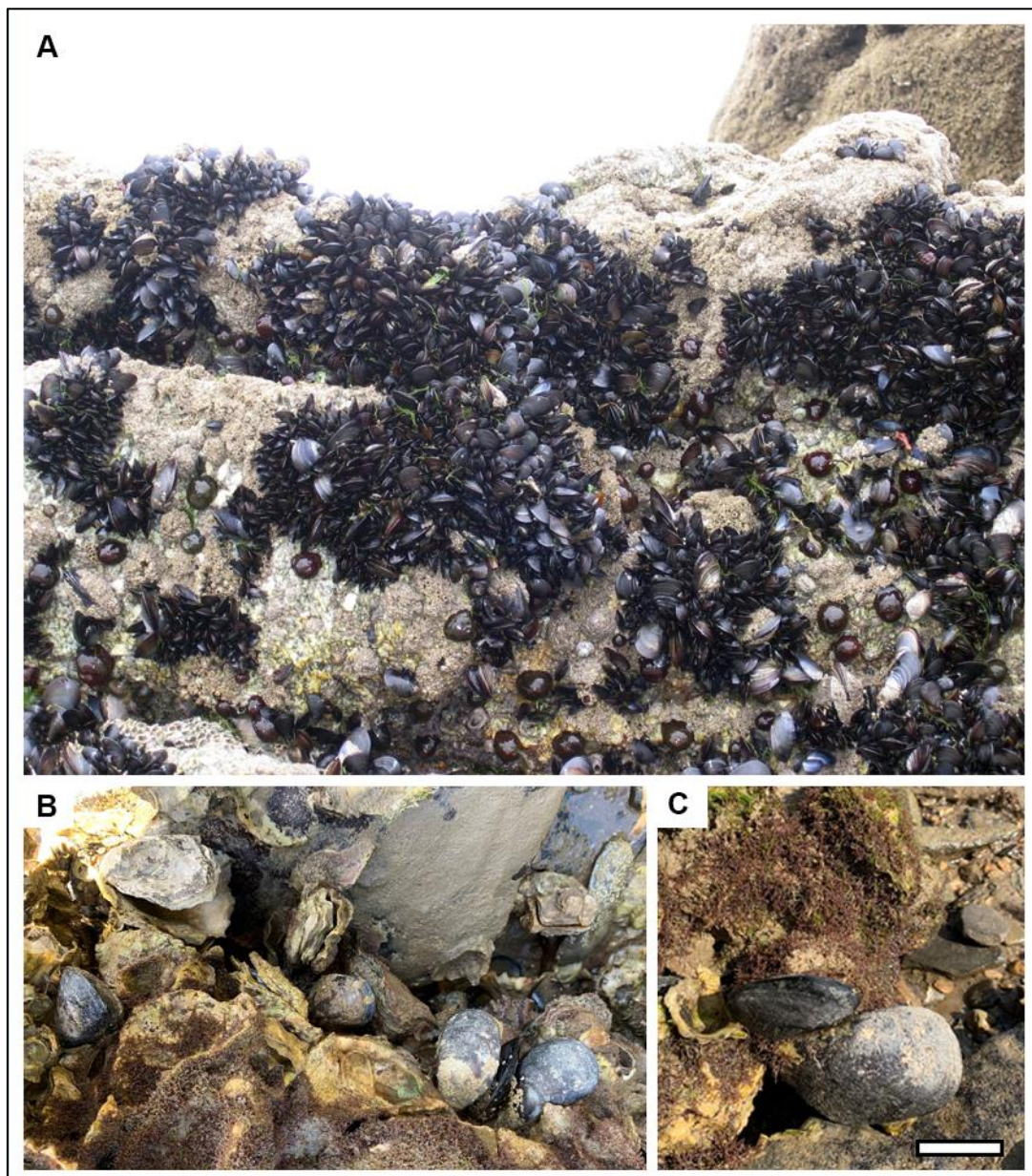
*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819

El bivalvo *M. galloprovincialis*, comúnmente llamado mejillón mediterráneo, es nativo del Mar Mediterráneo, el Mar Negro, el Mar Adriático, y el Océano Atlántico desde Irlanda a Marruecos (McDonald et al., 1991; Geller et al., 1994; Hilbish et al., 2010). Actualmente posee una amplia distribución global ya que es capaz de colonizar ambientes acuáticos dentro de un amplio intervalo de salinidad (His et al., 1989; Sanjuan et al., 1997) (Figura II.1). En el hemisferio norte puede encontrarse en California (McDonald y Koehn, 1988), Japón (Wilkins et al., 1983), Hong Kong (Lee y Morton, 1985), China y Corea (McDonald et al., 1991). En el hemisferio sur se lo encuentra en Sudáfrica y Namibia (Grant y Cherry, 1985; Branch y Steffani, 2004) y Australasia (McDonald et al., 1991). Además, en los últimos años ha sido reportado en América del Sur en las costas de Brasil, Uruguay, Chile e incluso Argentina (Seed, 1992; Daguin y Borsa, 2000; Toro et al., 2005; Astorga et al., 2015; Zbawicka et al., 2018; Belz et al., 2020; Lins et al., 2021). Su gran expansión no solo se debe a la introducción para su cultivo y el creciente tránsito marítimo, sino también a ciertas características que presenta la especie como su rápida tasa de crecimiento, alta tolerancia a la desecación, y gran capacidad de hibridación (McDonald et al., 1991; Branch y Steffani, 2004; Zbawicka et al., 2018). Por todo esto, se encuentra incluida en la lista de las 100 especies más invasoras del mundo (Lowe et al., 2004), publicada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés). Sin embargo, también posee un gran valor comercial para el consumo humano y es cultivada y comercializada a escala global (FAO, 2009).



**Figura II.1.** Distribución global de *Mytilus galloprovincialis*. Basado en los registros de ocurrencia de GBIF (GBIF.org (21 February 2023) GBIF Occurrence Download, 2023). El tamaño e intensidad de color de los círculos (amarillo: menos intenso, rojo: más intenso) es proporcional a la cantidad de registros en el área.

El mitílido *M. galloprovincialis*, suele tener un tamaño promedio de 5 cm de largo (Figura II.2) aunque puede alcanzar los 12 cm de largo. Es una especie dioica que presenta fecundación externa y una larva velígera libre, nadadora y planctotrófica. Este bivalvo es un ingeniero ecosistémico que se alimenta por filtración de fitoplancton y detritos orgánicos y tiene un rol principal en las redes tróficas de los ambientes que habita.



**Figura II.2.** El mitílido *Mytilus galloprovincialis* en los intermareales de la costa española. **A.** Banco de mejillinar en Galicia. **B.** Comunidad del mejillinar en Plentzia donde se observan distintas algas y ostras asociadas. **C.** Detalle de mejillones de Plentzia donde se observa su gran tamaño. Escala 2 cm.

Con respecto a su ciclo reproductivo, son maduros sexualmente al año de vida y presenta un largo periodo de puesta que incluso puede ser continuo a lo largo del año (Seed, 1969). En ambientes estuarinos y costeros, se ha observado diferencias en el ciclo reproductivo entre las distintas poblaciones e incluso entre las mismas poblaciones pero de distintos años (Azpeitia et al., 2017). En mejillones nativos de la Bahía de Vizcaya, se observó que la gametogénesis ocurre en los meses de invierno y son reproductivamente activos en primavera. Además, en años cálidos y con altos registros de nutrientes, puede presentarse un

segundo pico reproductivo entre verano y otoño (Garmendia et al., 2010; Ortiz-Zarragoitia et al., 2011; Cuevas et al., 2015).

### ***Mytilus galloprovincialis* como organismo bioindicador y centinela de contaminación ambiental**

Las especies del complejo *Mytilus* han sido ampliamente empleadas como centinelas de contaminación ambiental en programas de monitoreo durante décadas (Goldberg, 1975; Davies y Vethaak, 2012; Farrington et al., 2016; Beyer et al., 2017). Particularmente, *Mytilus galloprovincialis* es una de las especies más utilizadas alrededor del mundo (Widdows y Donkin, 1992). La implementación de esta especie como bioindicadora y centinela se debe en gran parte a que organizaciones como OSPAR, ICES o UNEP, a lo largo de los años, han impulsado políticas que regulan la cooperación internacional para la protección del medio ambiente, haciendo hincapié en la necesidad de unificar criterios en los análisis y de esquemas de trabajo (Roose et al., 2011; JPI-Oceans, 2021). De esta manera, se cuenta con una amplia información sobre los niveles base de distintos biomarcadores y respuestas fisiológicas en *M. galloprovincialis* en distintas ubicaciones del hemisferio norte (Davies y Vethaak, 2012; Vethaak et al., 2017). Así, son numerosos los registros de los efectos, a distintos niveles de organización, de contaminantes como metales (Vlahogianni et al., 2007; Besada et al., 2008), hidrocarburos (Cajaraville et al., 1993; Orbea et al., 1999) o policlorobifenilos (Zorita et al., 2007a), y la especie ha sido utilizada tanto en monitoreos pasivos como activos (Marigómez et al., 2004, 2013b; Orbea y Cajaraville, 2006; Bocchetti et al., 2008; Lekube et al., 2014)

Se ha observado que, según su ubicación geográfica, *M. galloprovincialis* puede presentar diferencias en las respuestas biológicas generadas por un mismo contaminante (Baumard et al., 1998a, 1999; Besada et al., 2008; Garmendia et al., 2010). Dado que pueden producirse diferencias entre los ciclos reproductivos de poblaciones cercanas o incluso en una misma población en distintos años (Azpeitia et al., 2017), los parámetros reproductivos han sido históricamente incluidos en los estudios de monitoreo que utilizan a esta especie.

Recientemente, en la Bahía de Vizcaya, Blanco-Rayón y colaboradores (2020) observaron que la bioacumulación y los niveles de respuesta de distintos biomarcadores presentaron variaciones relacionadas al sexo y estadio reproductivo de los mejillones aunque sin patrones claros. Por este motivo, los autores remarcan la importancia de incluir la identificación del sexo o estadios de desarrollo gametogénico al utilizar a esta especie como bioindicadora. En la Bahía de Vizcaya, el estado de salud ambiental ha sido evaluado en numerosas ocasiones analizando los efectos de contaminantes heredados en *M. galloprovincialis* (Marigómez et al., 2004; Cajaraville et al., 2006, 2016; Garmendia et al., 2011b, 2011a; Ortiz-Zarragoitia et al., 2011). Los estudios incluyen evaluaciones a distintos niveles de organización biológica, desde el uso de biomarcadores moleculares, celulares y tisulares (Bartolomé et al., 2010; Garmendia et al., 2010; Lekube et al., 2014; Cuevas et al., 2015; Blanco-Rayón et al., 2020) hasta respuestas fisiológicas (de los Ríos et al., 2013, 2016b). Además, en este área, la especie también ha sido utilizada para evaluar la acumulación de contaminantes de preocupación emergente como son los microplásticos (MP) (Mendoza et al., 2020). Alrededor del mundo, son numerosos los trabajos que han utilizado a esta especie para evaluar los efectos de los MP tanto en estudios de campo (Bråte et al., 2018b; Li et al., 2019; Reguera et al., 2019; Gedik y Eryas, 2020) como de laboratorio (Li et al., 2015; Vandermeersch et al., 2015; Bråte et al., 2018a).

## II.IV METODOLOGÍA GENERAL

### Sitios de estudio

El golfo de Vizcaya se encuentra en el Océano Atlántico norte y se ubica desde la isla de Quessant en Bretaña, Francia, hasta el cabo Ortegal en Galicia, España (Europa). En España, la bahía de Vizcaya se extiende en las costas de las comunidades autónomas de Galicia, Asturias, Cantabria y el País Vasco.

Los sitios de estudio corresponden a dos localidades con distinto tipo de impacto antrópico ubicadas en dos estuarios de la bahía de Vizcaya en el País Vasco (Figura II.3). El

primer sitio, Arriluze ( $43^{\circ}20'48''\text{N}$   $3^{\circ}01'42''\text{O}$ ), se trata de un puerto deportivo ubicado en el estuario de Bilbao (Figura II.3). Dicho estuario tiene una extensión de 22 km, es principalmente euhalino y posee una amplitud macro-mesomareal con un régimen de mareas semidiurno (Uriarte y Villate, 2004; Iriarte et al., 2016). La población asociada es de tipo urbana y en el estuario se distinguen dos partes, una externa que consiste en una ensenada costera semicerrada, y una interna (15 km de longitud aprox.) que atraviesa el área metropolitana de Bilbao (Uriarte y Villate, 2004; Iriarte et al., 2016). Históricamente ha sido considerado un sitio contaminado principalmente debido a distintas actividades portuarias, urbanas, industriales, agrícolas o relacionadas al desecho de aguas tratadas (Cajaraville et al., 2016; Briaudeau et al., 2019). Distintos compuestos como metales, hidrocarburos y contaminantes de preocupación emergente, que causan efectos negativos en la biota (Cajaraville et al., 2003; de los Ríos et al., 2016b; Blanco-Rayón et al., 2020), han sido detectados en sedimento y biota en este sitio (Prieto et al. 2008, Rodríguez et al. 2009, Bartolomé et al. 2010, Puy-Azurmendi et al. 2013). Sin embargo, en los últimos años se ha reportado una disminución en las concentraciones de los contaminantes y sus efectos en la biota, lo que sugiere una recuperación gradual del estuario de Bilbao (Borja et al., 2010; Iriarte et al., 2016; Briaudeau et al., 2019).

El segundo sitio, Plentzia ( $43^{\circ}24'38''\text{N}$   $2^{\circ}57'2''\text{O}$ ), se trata de un sitio relativamente limpio con un puerto pesquero ubicado en el estuario de Butroe (Figura II.3). Dicho estuario tiene una extensión de 8 km, es principalmente eurihalino en su desembocadura y posee una amplitud mesomareal con un régimen de mareas semidiurno (Villate et al., 1989). La población asociada es pequeña, aunque aumenta en los meses de verano debido al atractivo de las playas de Plentzia y Gorniz, ubicadas en la bahía (Orbea et al., 2002). Sus efluentes son tratados en Mungia y las actividades agrícolas e industriales se desarrollan 15 km río arriba del Butroe, por lo que se considera que generan un mínimo impacto ambiental (Saiz-Salinas, 1997; Cortada y Collins, 2013; Lekube et al., 2014). Por estos motivos, históricamente ha sido considerado un sitio de referencia en estudios de monitoreo ambiental de la contaminación (Orbea et al., 2002; de los Ríos et al., 2013, 2016a; Briaudeau et al., 2020), principalmente al

compararlo con Arriluze (Soto et al., 1995; Saiz-Salinas, 1997; Orbea et al., 1999; Lekube et al., 2014; Blanco-Rayón et al., 2020).



**Figura II.3.** Sitios de estudio y muestreo en dos estuarios de la costa de la Bahía de Vizcaya.

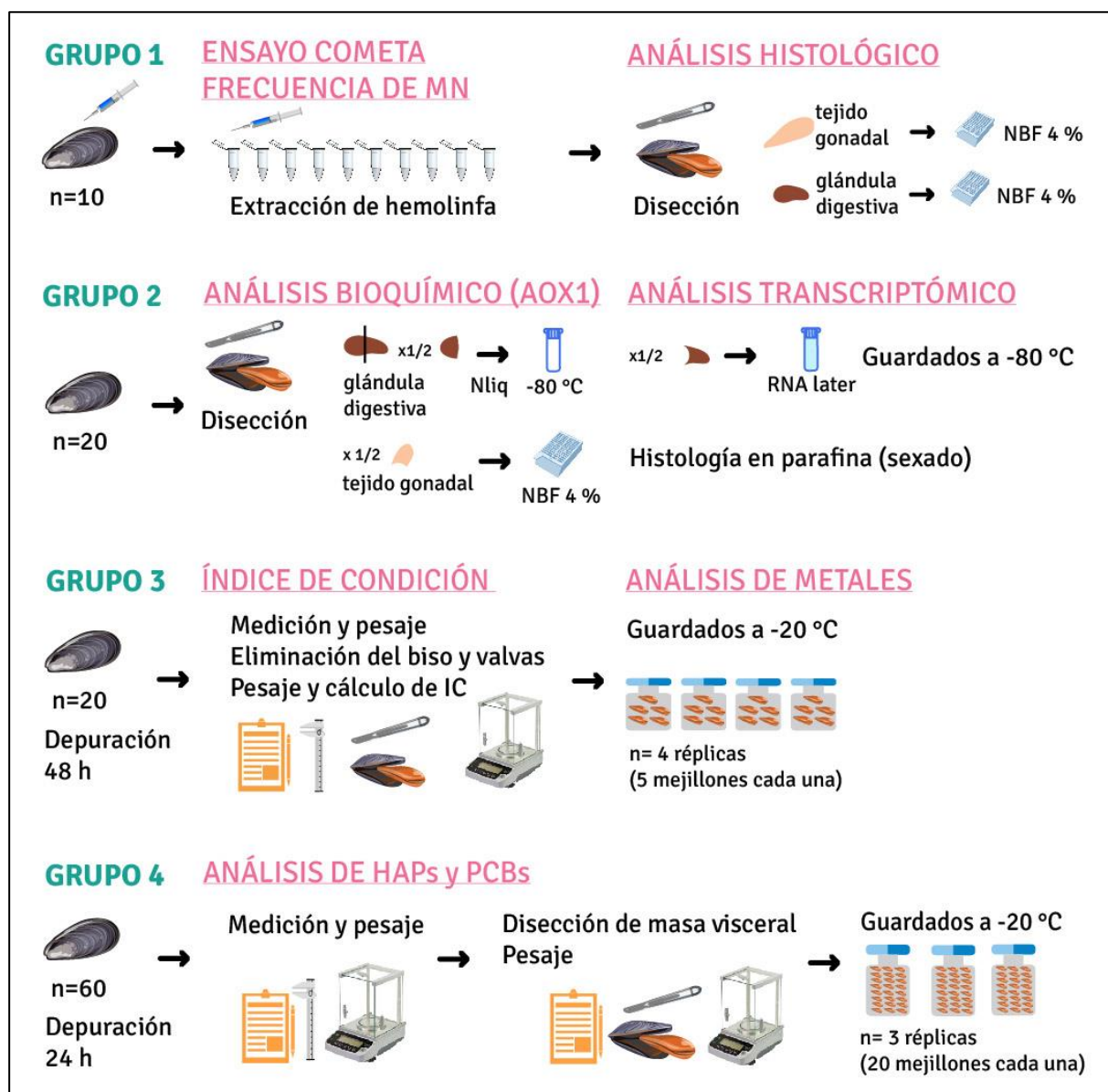
## Muestreo

El muestreo se realizó el 8 de junio de 2021 durante la marea baja en el intermareal rocoso de Plentzia y Arriluze. En cada sitio de estudio se recolectaron manualmente individuos adultos de *M. galloprovincialis* (3,5-4,5 cm de longitud de valva,  $n = 120$ ), muestras de sedimentos superficiales (50 mL;  $n = 4$ ) y de agua superficial (50 mL;  $n = 4$ ). Las muestras fueron transportadas a la Estación Marina de Plentzia (UPV/EHU) para su procesado. Datos físico-ambientales como temperatura, salinidad y pH del agua fueron registrados con un

sensor multiparamétrico en zonas aledañas por otros miembros del grupo BCTA el 25 de junio de 2021.

## Procesado de muestras

Una vez en el laboratorio, las muestras de sedimentos se almacenaron a -40°C hasta ser analizadas. Los animales fueron divididos en 4 grupos para ser disecados, procesados, fijados y almacenados según correspondía para el tipo de análisis a realizar (Figura II.4). A los mejillones del Grupo 1 (n = 10) se les extrajo la hemolinfa para realizar el ensayo cometa y de frecuencia de micronúcleos. Luego, la glándula digestiva y tejido gonadal fueron disecados y fijados en formaldehído buffer neutro 10 % (NBF 10 %) para los análisis histológicos. Al Grupo 2 (n = 20) se les disecó la glándula digestiva y tejido gonadal para los análisis bioquímicos y transcriptómicos. La glándula digestiva fue dividida en dos partes iguales que fueron pesadas: una mitad fue criopreservada en nitrógeno líquido y luego guardada a -80 °C (bioquímica) y la otra mitad se guardó en RNAlater a -80 °C (transcriptómica). Del tejido gonadal se tomó una pequeña porción que fue fijada en NBF 10 % para la determinación de los sexos mediante histología en parafina. Para la determinación de metales (n = 20, Grupo 3) los individuos fueron ubicados en peceras a temperatura y fotoperíodo controlado durante 48 h para dejarlos depurar antes de remover la masa visceral y conservarla a -20 °C. Estos mejillones también fueron utilizados para la determinación del índice de condición. Para las determinaciones analíticas de HAPs y PCBs (n = 60, Grupo 4) los individuos fueron depurados durante 24 °C antes de ser disecados y conservados a -40 °C. Los protocolos de todos los análisis previamente mencionados se detallan en la sección Materiales y Métodos de cada capítulo de esta Sección II y en el Anexo.



**Figura II.4.** Procesado de muestras de *Mytilus galloprovincialis* en diferentes grupos según los distintos análisis realizados. El n indicado en cada grupo corresponde al número de individuos de cada sitio de estudio. AOX1: actividad de la enzima palmitoil-CoA oxidasa; HAPs: hidrocarburos aromáticos policíclicos; IC: índice de condición; MN: micronúcleos; Nliq: nitrógeno líquido; PCBs: policlorobifenilos.

## Análisis estadísticos

Para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los distintos resultados, se realizaron comparaciones de a pares entre los dos sitios de estudio. Antes de realizar cualquier prueba estadística se verificaron los supuestos (normalidad y homocedasticidad) correspondientes al análisis estadístico que se pretendía usar. En caso de no cumplirse los supuestos del modelo a utilizar, los datos fueron

transformados y si aún no se cumplían, fueron evaluados a través de análisis no paramétricos. Para todos los análisis se estableció un nivel de significancia del 95% ( $p < 0,05$ ) y se utilizó el programa STATISTICA 13 (StatSoft, Inc.). El tipo de prueba estadística realizada para cada análisis y set de datos se detalla en la sección Materiales y Métodos de cada capítulo.

**CAPÍTULO 1. Presencia de contaminantes en**  
***Mytilus galloprovincialis* en ambientes con distinto tipo de**  
**impacto antrópico**

## 1.1 MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1.1 Factores ambientales

La temperatura, salinidad y pH del agua de los sitios de estudio fue compartida por otros miembros del grupo BCTA quienes registraron estos parámetros el 25 de junio de 2021, utilizando un sensor multiparamétrico digital (YSI EXO Multiparameter Sonde).

### 1.1.2 Compuestos orgánicos persistentes y metales traza en sedimento

Las muestras de sedimento superficial recolectas en los sitios de estudio ( $n = 4$ ; 55 g cada una) fueron enviadas a IPROMA/EUROFINS para las determinaciones analíticas de compuestos orgánicos persistentes y metales traza.

Se analizó la presencia de los siguientes compuestos orgánicos persistentes: hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y policlorobifenilos (PCBs), en las muestras de sedimento a través de cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (GC-MS). Solo se analizaron los 16 HAPs prioritarios: acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(g, h, i)perileno, criseno, dibenzo(a, h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3, c, d)pireno, naftaleno y pireno. Los 11 PCBs analizados fueron: PCB 149, PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 118, PCB 153, PCB 180, PCB 138, PCB 18, PCB 31, PCB 44, PCB 194, PCB 105 y PCB 156. El límite de detección (LD) para los HAPs analizados en los sedimentos de ambos sitios fue de 20,0 ng/g peso seco (ng/g ps). El LD para los congéneres de PCB 28+31 fue de 4,0 ng/g ps y el LD para los congéneres de PCB 52, 101, 118, 153, 180, 138, 18, 44, 194 y 149 fue de 2,0 ng/g ps en sedimentos. Los resultados obtenidos para HAPs totales y PCBs totales ( $\Sigma$ HAP y  $\Sigma$ PCBs) en ambos sitios se expresaron como la suma de los valores de la media  $\pm$  desvío estándar, en ng/g ps.

Se realizó el análisis químico de metales a través de espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Se analizaron 10 metales traza: aluminio (Al),

arsénico (Ar), cadmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr), hierro (Fe), níquel (Ni), plomo (Pb), selenio (Se) y zinc (Zn). Los resultados se reportaron como la media  $\pm$  desvío estándar, en  $\mu\text{g/g ps}$ .

Con el fin de poder evaluar los potenciales efectos biológicos adversos de los HAPs,  $\Sigma\text{PCBs}$  y metales presentes en los sedimentos, se utilizó la Guía de Calidad de Sedimentos (SQG, por sus siglas en inglés) descripta por Long y colaboradores (2006). En esta clasificación se usan valores de referencia denominados Efecto de Rango Bajo (ERL) y Efecto de Rango Medio (ERM) en donde: si la concentración del contaminante es  $< \text{ERL}$  los efectos adversos son raramente observados; si está entre el ERL y ERM los efectos adversos son ocasionalmente observados y si es  $> \text{ERM}$  los efectos adversos son frecuentemente observados. El potencial del contaminante para causar efectos biológicos adversos se evaluó a través de la estimación de los Cocientes Guía de Calidad de Sedimentos (SQG-Qs, por sus siglas en inglés) como la relación entre el nivel del contaminante y su respectivo ERM. Finalmente, los sedimentos de ambos sitios fueron categorizados según su riesgo toxicológico para cada tipo de contaminante de la siguiente manera: SQG-Q  $<0,1$  = sedimento no impactado; SQG-Q  $0,1-1$  = sedimento moderadamente impactado; SQG-Q  $>1$  = sedimento altamente impactado (MacDonald et al., 2004).

### 1.1.3 Compuestos orgánicos persistentes y metales traza en mejillones

El análisis de compuestos orgánicos persistentes (HAPs y PCBs) en masa visceral de *M. galloprovincialis* se hizo a partir del Grupo 4 ( $n = 60$ ). Luego de 24 h de depuración, los mejillones fueron disecados, pesados y separados en 4 *pools* de 50 g aproximadamente cada uno. Las muestras (3 réplicas de 20 mejillones cada una) fueron conservadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta ser enviadas IPRONA/EUROFINS para los análisis químicos mediante GC-MS. Se analizaron los mismos 16 HAPs y 11 PCBs que en las muestras de sedimento. El LD fue de  $5,0\text{ ng/g ps}$  para los 16 HAPs y de  $1,0\text{ ng/g ps}$  para los 11 PCBs. Los resultados obtenidos para HAPs y PCBs totales ( $\Sigma\text{HAPs}$  y  $\Sigma\text{PCBs}$ ) en ambos sitios se expresaron como la suma de los valores de la media  $\pm$  desvío estándar, en  $\text{ng/g ps}$ .

El análisis de metales traza en masa visceral de *M. galloprovincialis* se hizo a partir del Grupo 3 (n = 20). Luego de 48 h de depuración, los mejillones fueron disecados, pesados y separados en 4 pools de 5 g aproximadamente cada uno. Las muestras (4 réplicas de 5 mejillones cada una) fueron conservadas a -20 °C hasta ser enviadas IPROMA/EUROFINS para el análisis químico de metales a través de ICP-MS. Se analizaron los 10 mismos metales que en las muestras de sedimento.

### 1.1.4 Evaluación del origen de los hidrocarburos aromáticos policíclicos

Con el fin de evaluar el posible origen (*i.e* pirogénico o pirolítico) de los hidrocarburos aromáticos presentes en los sedimentos y el mejillón de los sitios de estudio se calcularon tres índices de evaluación:

- Benzo(a)antraceno/(benzo(a)antraceno + criseno) (BaA/228): valores menores que 0,2 se atribuyen a fuentes petrogénicas, mayores que 0,35 indican origen pirolítico, mientras que valores entre 0,2 y 0,35 indican un origen mixto.
- Fluoranteno/(fluoranteno + pireno) (Fl/(Fl + Py)): valores menores que 0,4 se atribuye a fuentes petrogénicas, mayores que 0,5 a la combustión de maderas, mientras que valores intermedios a la combustión de petróleo.
- Antraceno/(antraceno + fenantreno) (Ant/(Ant + Phe): valores menores que 0,1 se atribuye a fuentes petrogénicas, mayores a 0,1 indican combustión.

### 1.1.5 Análisis estadísticos

Dado que se contó con réplicas, las determinaciones de compuestos orgánicos persistentes y metales en sedimento y biota fueron analizadas estadísticamente para evaluar las diferencias entre sitios de estudio. Puesto que no se cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad (comprobados mediante la prueba de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente), se utilizó de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U test de comparación de a pares. Para todos los análisis, se estableció un nivel de significancia del 95% ( $p < 0,05$ ) y se utilizó el programa STATISTICA 13 (StatSoft, Inc.).

## 1.2 RESULTADOS

### 1.2.1 Factores ambientales

La temperatura, salinidad y pH del agua de los sitios de estudio se muestran en la Tabla II.1. La temperatura y el pH en ambos sitios es similar, en cambio la salinidad en Arriluze es menor por ser la desembocadura de un estuario.

**Tabla II.1.** Temperatura, salinidad y pH del agua registrados el 25 de junio de 2021 en Plentzia y Arriluze.

| SITIO    | TEMPERATURA | SALINIDAD | PH  |
|----------|-------------|-----------|-----|
| PLENTZIA | 18,6 °C     | 34,23 ups | 7,8 |
| ARRILUZE | 18,8 °C     | 26,78 ups | 7,6 |

ups = unidades prácticas de salinidad

### 1.2.2 Compuestos orgánicos persistentes y metales traza en sedimento

Los resultados del análisis de hidrocarburos aromáticos en sedimento se resumen en la Tabla II.2. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de  $\Sigma$ HAPs entre ambos sitios ( $p > 0,05$ ) y su SQG-Q es  $< 0,1$ . De los 16 HAPs prioritarios analizados solo el acenafteno se encontró por debajo del límite de detección en ambos sitios. Solo se observaron diferencias significativas en las concentraciones medias de los siguientes HAPs individuales: benzo(b)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno e indeno(1,2,3,c,d)pireno, siendo siempre mayor en Arriluze ( $p < 0,05$ ). La mayoría de los PAHs detectados se encuentran entre ERL y ERM, excepto para el fenantreno, fluoranteno, naftaleno y pireno que se encuentran por debajo de ERL. En Plentzia las concentraciones de dibenzo(a,h)antraceno se encuentran muy por encima del ERM, y en consecuencia su SQG-Q es superior a 1.

**Tabla II.2.** Concentraciones (media  $\pm$  DE, ng/g peso seco) de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de sedimento de Plentzia y Arriluze. Letras distintas representan diferencias significativas entre sitios ( $p < 0,05$ ). Se incluye la significancia toxicológica de los hidrocarburos en cada sitio, expresada mediante los Cocientes Guía de Calidad de Sedimentos (SQG-Qs) usando los valores guía, establecidos por Long y colaboradores (1995).

| LD                             | HAPs                    | PLENTZIA                                 | ARRILUZE                              | ERL         | ERM          | SQG-Q<br>PLENTZIA | SQG-Q<br>ARRILUZE |
|--------------------------------|-------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------|-------------|--------------|-------------------|-------------------|
| 20                             | Acenafteno              | <LD                                      | <LD                                   | 16          | 500          | -                 | -                 |
| 20                             | Acenaftileno            | 45 $\pm$ 22,30 a                         | 50 $\pm$ 21,73 a                      | 44          | 640          | 0,07              | 0,08              |
| 20                             | Antraceno               | 134,50 $\pm$ 29,49 a                     | 99,75 $\pm$ 47,53 a                   | 85,3        | 1100         | 0,12              | 0,09              |
| 20                             | Benzo(a)antraceno       | 210 $\pm$ 24,51 a                        | 202,5 $\pm$ 53,31 a                   | 261         | 1600         | 0,13              | 0,13              |
| 20                             | Benzo(b)fluoranteno     | 169 $\pm$ 16,63 a                        | 219,5 $\pm$ 37,72 b                   | -           | -            | -                 | -                 |
| 20                             | Benzo(k)fluoranteno     | 184 $\pm$ 22,33 a                        | 199 $\pm$ 32,89 a                     | -           | -            | -                 | -                 |
| 20                             | Benzo(a)pireno          | 160,75 $\pm$ 11,93 a                     | 188 $\pm$ 40,48 a                     | 430         | 1600         | 0,10              | 0,12              |
| 20                             | Benzo(g,h,i)perileno    | 92 $\pm$ 9,42 a                          | 144,25 $\pm$ 24,85 b                  | -           | -            | -                 | -                 |
| 20                             | Criseno                 | 275,67 $\pm$ 66,15 a                     | 230,5 $\pm$ 52,14 a                   | 384         | 2800         | 0,10              | 0,08              |
| 20                             | Dibenzo(a,h)antraceno   | 450,5 $\pm$ 369,82 a                     | 23 $\pm$ 2,65 a                       | 63,4        | 260          | 1,73              | 0,09              |
| 20                             | Fenantreno              | 187,25 $\pm$ 47,68 a                     | 195,5 $\pm$ 131,66 a                  | 240         | 1500         | 0,12              | 0,13              |
| 20                             | Fluoranteno             | 453 $\pm$ 151,56 a                       | 538,25 $\pm$ 288,25 a                 | 600         | 5100         | 0,09              | 0,10              |
| 20                             | Fluoreno                | 41,75 $\pm$ 20,21 a                      | 34 $\pm$ 19,08 a                      | 19          | 540          | 0,08              | 0,06              |
| 20                             | Indeno(1,2,3,c,d)pireno | 124,5 $\pm$ 4,80 a                       | 161,25 $\pm$ 29,03 b                  | -           | -            | -                 | -                 |
| 20                             | Naftaleno               | 27 $\pm$ 5,66 a                          | 41,25 $\pm$ 10,40 a                   | 160         | 2100         | 0,01              | 0,02              |
| 20                             | Pireno                  | 285,75 $\pm$ 33,59 a                     | 354,5 $\pm$ 168,38 a                  | 665         | 2600         | 0,11              | 0,14              |
| <b><math>\Sigma</math>HAPs</b> |                         | <b>2419,75 <math>\pm</math> 406,74 a</b> | <b>2667 <math>\pm</math> 940,22 a</b> | <b>4022</b> | <b>44792</b> | <b>0,05</b>       | <b>0,06</b>       |

ERL: Efecto de Rango Bajo y ERM: Efecto de Rango Medio LD: Límite de detección; HAP: hidrocarburo aromático policíclico.

En Plentzia todos los PCBs analizados en las muestras de sedimento estuvieron por debajo del límite de detección (excepto el PCB 149), y en Arriluze, si bien se detectaron varios PCBs, los valores fueron bajos (Tabla II.3). Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en las concentraciones de  $\Sigma$ PCBs entre ambos sitios. Los valores de ERL y ERM para  $\Sigma$ PCBs es de 23 y 180 respectivamente, por lo que el valor de SQG-Q para Plentzia es de 0,013 y para Arriluze de 0,23.

Las concentraciones de los 10 metales analizados (Al, As, Cd, Cu, Cr, Fe, Ni, Pb, Se, Zn) fueron significativamente mayores en Arriluze que en Plentzia ( $p < 0,05$ ) (Tabla II.4). El Cu se encontró por debajo del LD en Plentzia, sin embargo, en Arriluze superó ampliamente el ERM, con un SQG-Q  $> 1,85$ , al igual que el Zn con un SQG-Q de 7,99.

**Tabla II.3.** Concentraciones (media  $\pm$  DE, ng/g peso seco) de policlorobifenilos en muestras de sedimento de Plentzia y Arriluze. Letras distintas representan diferencias significativas entre sitios ( $p < 0,05$ ).

| LD                             | PCB       | Plentzia                          | Arriluze                             |
|--------------------------------|-----------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| 4,0                            | PCB 28+31 | <LD                               | <LD                                  |
| 2,0                            | PCB 52    | <LD                               | <LD                                  |
| 2,0                            | PCB 101   | <LD                               | 4,23 $\pm$ 1,00                      |
| 2,0                            | PCB 118   | <LD                               | <LD                                  |
| 2,0                            | PCB 153   | <LD                               | 10,5 $\pm$ 1,29                      |
| 2,0                            | PCB 180   | <LD                               | 6,25 $\pm$ 2,22                      |
| 2,0                            | PCB 138   | <LD                               | 9,25 $\pm$ 1,26                      |
| 2,0                            | PCB 18    | <LD                               | <LD                                  |
| 2,0                            | PCB 44    | <LD                               | <LD                                  |
| 2,0                            | PCB 194   | <LD                               | 2,6 $\pm$ 0,18                       |
| 2,0                            | PCB 149   | 10                                | 8 $\pm$ 0,82                         |
| <b><math>\Sigma</math>PCBs</b> |           | <b>2,50 <math>\pm</math> 50 a</b> | <b>40,82 <math>\pm</math> 6,12 b</b> |

LD: límite de detección; PCB: policlorobifenilo.

**Tabla II.4.** Concentraciones (media  $\pm$  DE,  $\mu$ g /g peso seco) de metales traza en muestras de sedimento de Plentzia y Arriluze. Letras distintas representan diferencias significativas entre sitios ( $p < 0,05$ ). Se incluye la significancia toxicológica de los metales en cada sitio, expresada mediante los Cocientes Guía de Calidad de Sedimentos (SQG-Qs) usando los valores guía establecidos por Long y colaboradores (1995).

| LD   | METAL | PLENTZIA              | ARRILUZE                | ERL  | ERM  | SQG-Q<br>PLENTZIA | SQG-Q<br>ARRILUZE |
|------|-------|-----------------------|-------------------------|------|------|-------------------|-------------------|
| 1000 | Al    | 4477,5 $\pm$ 1065,7 a | 25927,8 $\pm$ 10655,3 b | -    | -    | -                 | -                 |
| 1,0  | As    | 11,0 $\pm$ 1,4 a      | 30,0 $\pm$ 7,4 b        | -    | -    | -                 | -                 |
| 0,05 | Cd    | 0,06 $\pm$ 0,01 a     | 0,9 $\pm$ 0,3 b         | 1,2  | 9,6  | 0,01              | 0,10              |
| 10   | Cu    | <LD                   | >500                    | 34   | 270  | -                 | > 1,85            |
| 1,0  | Cr    | 6,0 $\pm$ 1,4 a       | 65,0 $\pm$ 21,3 b       | 81   | 370  | 0,02              | 0,18              |
| 100  | Fe    | 6967,8 $\pm$ 269 a    | 30143,3 $\pm$ 5679,6 b  | -    | -    | -                 | -                 |
| 3,0  | Ni    | <LD                   | 31 $\pm$ 10,2 b         | 20,9 | 51,6 | -                 | 0,60              |
| 3,0  | Pb    | 7,5 $\pm$ 1,3 a       | 166,3 $\pm$ 24,3 b      | 46,7 | 218  | 0,03              | 0,76              |
| 0,2  | Se    | 0,9 $\pm$ 0 a         | 1,8 $\pm$ 0,4 b         | -    | -    | -                 | -                 |
| 10   | Zn    | 33,8 $\pm$ 6,1 a      | 3276,3 $\pm$ 1724,4 b   | 150  | 410  | 0,08              | 7,99              |

ERL: Efecto de Rango Bajo; ERM: Efecto de Rango Medio; LD: límite de detección

### 1.2.3 Compuestos orgánicos persistentes y metales en mejillones

Todos los HAPs analizados en masa visceral de *M. galloprovincialis* se encontraron por debajo del LD en ambos sitios (Tabla II.5). Asimismo, todos los PCBs analizados se hallaron por debajo del LD en los mejillones de ambos sitios (Tabla II.6).

**Tabla II.5.** Concentraciones (media  $\pm$  DE, ng/g peso seco) de hidrocarburos aromáticos policíclicos en ejemplares de *Mytilus galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze.

| LD<br>(ng/g ps)                | HAPs                    | PLENTZIA<br>media $\pm$ DE (ng/g ps) | ARRILUZE<br>media $\pm$ DE (ng/g ps) |
|--------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 5,0                            | Acenafteno              | <LD                                  | <LD                                  |
| 5,0                            | Acenaftileno            | <LD                                  | <LD                                  |
| 5,0                            | Antraceno               | <LD                                  | <LD                                  |
| 5,0                            | Benzo(a)antraceno       | <LD                                  | <LD                                  |
| 5,0                            | Benzo(b)fluoranteno     | <LD                                  | <LD                                  |
| 5,0                            | Benzo(k)fluoranteno     | <LD                                  | <LD                                  |
| 5,0                            | Benzo(a)pireno          | <LD                                  | <LD                                  |
| 5,0                            | Benzo(g,h,i)perileno    | <LD                                  | <LD                                  |
| 5,0                            | Criseno                 | <LD                                  | <LD                                  |
| 5,0                            | Dibenzo(a,h)antraceno   | <LD                                  | <LD                                  |
| 5,0                            | Fenantreno              | <LD                                  | <LD                                  |
| 5,0                            | Fluoranteno             | <LD                                  | <LD                                  |
| 5,0                            | Fluoreno                | <LD                                  | <LD                                  |
| 5,0                            | Indeno(1,2,3,c,d)pireno | <LD                                  | <LD                                  |
| 5,0                            | Naftaleno               | <LD                                  | <LD                                  |
| 5,0                            | Pireno                  | <LD                                  | <LD                                  |
| <b><math>\Sigma</math>HAPs</b> |                         | <b>&lt;LD</b>                        | <b>&lt;LD</b>                        |

LD: límite de detección; HAPs: hidrocarburos aromáticos policíclicos.

**Tabla II.6.** Concentraciones (media  $\pm$  DE, ng/g peso seco) de policlorobifenilos en ejemplares de *Mytilus galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze.

| LD<br>(ng/g ps)                | PCBs      | Plentzia<br>media $\pm$ DE (ng/g ps) | Arriluze<br>media $\pm$ DE (ng/g ps) |
|--------------------------------|-----------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1,0                            | PCB 28+31 | <LD                                  | <LD                                  |
| 1,0                            | PCB 52    | <LD                                  | <LD                                  |
| 1,0                            | PCB 101   | <LD                                  | <LD                                  |
| 1,0                            | PCB 118   | <LD                                  | <LD                                  |
| 1,0                            | PCB 153   | <LD                                  | <LD                                  |
| 1,0                            | PCB 180   | <LD                                  | <LD                                  |
| 1,0                            | PCB 138   | <LD                                  | <LD                                  |
| 1,0                            | PCB 18    | <LD                                  | <LD                                  |
| 1,0                            | PCB 44    | <LD                                  | <LD                                  |
| 1,0                            | PCB 194   | <LD                                  | <LD                                  |
| 1,0                            | PCB 149   | <LD                                  | <LD                                  |
| <b><math>\Sigma</math>PCBs</b> |           | <b>&lt;LD</b>                        | <b>&lt;LD</b>                        |

LD: límite de detección; PCBs: policlorobifenilos.

Las concentraciones de los 10 metales analizados (Al, As, Cd, Cu, Cr, Fe, Ni, Pb, Se, Zn) en la masa visceral de *M. galloprovincialis* se detallan en la Tabla II.7. Los metales más abundantes en las muestras de mejillones de ambos sitios fueron el Zn, Fe y Al. Las concentraciones de Cu, Cr y Ni se hallaron por debajo del LD en ambos sitios. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en el resto de los metales analizados excepto el Al, Fe, Se y Zn. Las concentraciones de Pb y Cd fueron mayores en Arriluze que en Plentzia, mientras que la concentración de As fue mayor en los ejemplares recolectados en Plentzia.

**Tabla II.7.** Concentraciones (media  $\pm$  de,  $\mu\text{g/g}$  peso seco) de metales traza en ejemplares de *Mytilus galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze. Letras distintas representan diferencias significativas entre sitios ( $p < 0,05$ ).

| LD<br>( $\mu\text{g/g ps}$ ) | Metal | PLENTZIA<br>media $\pm$ DE ( $\mu\text{g/g ps}$ ) | ARRILUZE<br>media $\pm$ DE ( $\mu\text{g/g ps}$ ) |
|------------------------------|-------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 7,0                          | Al    | 10,0 $\pm$ 3,5 a                                  | 16,7 $\pm$ 12,5 a                                 |
| 1,0                          | Ar    | 1,98 $\pm$ 0,17 a                                 | 1,58 $\pm$ 0,1 b                                  |
| 0,1                          | Cd    | 0,12 $\pm$ 0,01 a                                 | 0,29 $\pm$ 0,1 b                                  |
| 5,0                          | Cu    | <LD                                               | <LD                                               |
| 1,0                          | Cr    | <LD                                               | <LD                                               |
| 7,0                          | Fe    | 25,0 $\pm$ 5,7 a                                  | 22,5 $\pm$ 4,6 a                                  |
| 1,0                          | Ni    | <LD                                               | <LD                                               |
| 0,2                          | Pb    | <LD                                               | 0,4 $\pm$ 0,2                                     |
| 0,5                          | Se    | 0,53 $\pm$ 0,06 a                                 | 0,63 $\pm$ 0,1 a                                  |
| 7,0                          | Zn    | 20,0 $\pm$ 11,2 a                                 | 32,0 $\pm$ 21,6 a                                 |

LD: límite de detección.

## 1.2.4 Evaluación del origen de los hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los índices de evaluación del posible origen de los hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en los sedimentos de los sitios de estudio se detallan en la Tabla II.8. Los valores observados para el índice FI/(FI + Py) fueron mayores que 0,5 mientras que para Ant/(Ant + Phe) fueron mayores que 0,1.

**Tabla II.8.** Valores de los índices de evaluación de hidrocarburos aromáticos en sedimentos de Plentzia y Arriluze.

| Índice          | Plentzia | Arriluze |
|-----------------|----------|----------|
| BaA/228         | 0,58     | 0,81     |
| FI/(FI + Py)    | 0,61     | 0,60     |
| Ant/(Ant + Phe) | 0,42     | 0,34     |

BaA/228: Benzo(a)antraceno/(benzo(a)antraceno + criseno); FI/(FI + Py): Fluoranteno/(fluoranteno + pireno); Ant/(Ant + Phe): Antraceno/(antraceno + fenantreno).

## 1.2.5 Compuestos orgánicos y metales traza en agua

Las determinaciones analíticas en las muestras de agua no pudieron realizarse ya que no se contó con cantidad suficiente de muestra. Las mismas habían sido tomas siguiendo los requerimientos de cantidades de la compañía en la que originalmente se iban a realizar las determinaciones. Sin embargo, por cuestiones de confiabilidad, se decidió realizar todas las determinaciones en IPROMA/EUROFINS, donde las cantidades requeridas por esta compañía fueron mayores a las inicialmente contempladas.

## 1.3 DISCUSIÓN

Los compuestos orgánicos persistentes (COP), como los hidrocarburos aromáticos policíclicos y los policlorobifenilos, están presentes en los ambientes acuáticos de todo el mundo debido a su amplio uso, su capacidad para ser transportados y su persistencia. Por otro lado, los metales también podrían considerarse contaminantes persistentes, debido a su capacidad para adsorberse en los sedimentos y acumularse en la biota. Algunos de estos COP han sido prohibidos (UNEP, 2019), sin embargo, otros como los HAPs continúan siendo liberados al ambiente a través de la quema de combustibles fósiles o derrames de petróleo. Lo mismo sucede con los metales, que pueden ser introducidos en los estuarios a través de la escorrentía del río, vertidos de aguas residuales urbanas e industriales, entre otros. Los PCBs, son contaminantes orgánicos hidrofóbicos, sintéticos, fabricados principalmente con propósitos industriales. Actualmente, su fabricación y uso se encuentran prohibidos (UNEP, 2019), sin embargo, debido a su persistencia aún se pueden encontrar en concentraciones que pueden provocar toxicidad (Lohmann y Belkin, 2014).

Los ambientes costeros y los estuarios en las áreas metropolitanas, generalmente presentan elevadas concentraciones de contaminantes persistentes. Uno de los sitios de estudio de este trabajo, Arriluze, se encuentra en el estuario de Bilbao, un área que fue considerada altamente contaminada en la década del 90 (Orbea et al., 1999, 2002; Lekube et al., 2014), aunque gracias al desarrollo de nuevas plantas de tratamiento de efluentes esta contaminación se redujo (Borja et al., 2010; Iriarte et al., 2016; Briaudeau et al., 2019). El otro

sitio estudiado, se encuentra en el estuario de Plentzia y es considerado un sitio de referencia (Marigómez et al., 2005).

En este trabajo, se observaron diferentes contaminantes en los sedimentos de los dos sitios con diferentes niveles de potencial toxicidad. Desde los años 90 se lleva a cabo un monitoreo activo de los ecosistemas marinos y estuariales de la Bahía de Vizcaya y Galicia, y en especial del estuario de Bilbao (Cajaraville et al., 2016; Briaudeau et al., 2020). En estos estudios, se observó una tendencia general de recuperación del estado de salud del estuario, con esporádicos eventos críticos y puntuales como el dragado de sedimentos y el hundimiento del barco cisterna “Prestige” (Marigómez et al., 2013a; Cajaraville et al., 2016). Este accidente sucedió en las costas de Galicia en 2002, y provocó un derrame de más de 60000 toneladas de petróleo que afectaron a más de 1000 km de la costa de la bahía (Orbea et al., 2006). Estudios previos al derrame del Prestige, reportaban bajas concentraciones de HAPs en los sedimentos de Plentzia (897 ng/g ps) mientras que los registrados en el estuario de Bilbao eran altos (7960,3 ng/g ps) (Saiz-Salinas, 1997). Luego de ese evento, se observó una bioacumulación de HAPs en los mejillones y los biomarcadores estudiados demostraron efectos a largo plazo (Izagirre et al., 2014), aunque estos niveles comenzaron a disminuir a partir del año 2004 (Cajaraville et al., 2006).

En el presente trabajo, se encontraron niveles significativos de  $\Sigma$ HAPs en los sedimentos de Arriluze y Plentzia, aunque no se encontraron diferencias entre los sitios, y según los índices de evaluación del potencial origen podemos inferir que la fuente principal es la combustión. Briaudeau y colaboradores (2020) encontraron valores similares de  $\Sigma$ HAPs en sedimentos de Plentzia, aunque los índices indicaron que el origen era petrogénico. Los valores observados en Arriluze fueron un poco menores que los de los últimos registros (Briaudeau et al., 2019). Sin embargo, el muestreo del presente trabajo fue realizado durante 2021, cuando debido a las restricciones del confinamiento por COVID-19, las actividades náuticas (una de las fuentes de HAPs) estaban prohibidas. Este podría ser un motivo por el cual los valores observados en el presente estudio fueron menores que los de los registros previos. Según los SQG-Q calculados para  $\Sigma$ HAPs, ambos sitios pueden considerarse no contaminados. Sin embargo, las concentraciones de ciertos HAPs individuales indican lo

contrario, muchos de ellos se encuentran entre el ERL y ERM, por lo que su nivel de contaminación es moderado, lo que sugiere potenciales efectos biológicos. Por otro lado, en Plentzia se encontraron altas concentraciones de dibenzo(a,h)antraceno en los sedimentos, lo que indica que el ambiente está altamente contaminado por este compuesto. En los mejillones de los dos sitios no se encontraron concentraciones de HAPs por encima del LD a diferencia de lo observado en otros estudios en la misma zona (Soriano et al., 2006; Bartolomé et al., 2010; Fernández et al., 2010; Blanco-Rayón et al., 2020). Blanco Rayón y colaboradores (2020) encontraron, en mejillones recolectados en Arriluze, que  $\Sigma$ HAPs era menor en los meses más cálidos, patrón similar a lo observado en otros mejillones de regiones templadas. Además, se ha observado que en bivalvos la depuración de HAPs puede ocurrir con la puesta de gametas (Ruiz et al., 2011; Xiu et al., 2015). Dado que este estudio se realizó en primavera-verano, y los mejillones de ambos sitios se encontraron principalmente en estadio de puesta (ver Capítulo 2 de esta Sección) esta podría ser una explicación del porqué no se detectaron HAPs en los mejillones de ninguno de los sitios. Por otro lado, las concentraciones de  $\Sigma$ PCBs en sedimentos fueron mucho mayores en Arriluze que en Plentzia, presentando Arriluze un valor de SQG-Q de 0,23, lo que corresponde a un sitio de moderada contaminación, similar a lo reportado por Briaudeau y colaboradores (2019). En los mejillones de los dos sitios no se encontraron concentraciones de PCBs por encima del LD a pesar de que otros estudios han reportado lo contrario (Orbea y Cajaraville, 2006; Bartolomé et al., 2010). Sin embargo, similar a lo ocurrido con los HAPs, la ausencia de detección de PCBs podría estar relacionada al periodo muestreado ya que en *M. edulis* también se observó una significativa disminución de las concentraciones de este contaminante debido a la puesta de gametas (Hummel et al., 1990).

Los niveles de metales encontrados en los sedimentos de Plentzia están por debajo de los límites de toxicidad establecidos y se encontraron dentro del intervalo de valores reportado para este sitio en los últimos años (Briaudeau et al., 2019, 2020). Mientras que los niveles de metales encontrados en Arriluze son similares a los encontrados por Katsumiti en el año 2020 (datos sin publicar) y en Pasaia, otro estuario ubicado en la Bahía de Vizcaya, a unos 100km al este de Arriluze (Briaudeau et al., 2020). Además, los mayores niveles de

metales encontrados en Arriluze están relacionados con la historia del área donde se han desarrollado distintas actividades industriales a lo largo de los años (Belzunce et al., 2007). Algunos metales, como el Cd, Cr, Ni y Pb presentan un riesgo moderado ya que se encuentran entre el ERL y el ERM, sin embargo, el Cu y el Zn superan el ERM. A pesar de que el Cu no se detectó en *M. galloprovincialis* y el Zn está dentro de los valores basales, por ser un elemento esencial (Besada et al., 2014), esta acumulación en sedimentos podría generar efectos biológicos negativos en el futuro. Las concentraciones de metales detectadas en los mejillones de Arriluze se encuentran por debajo de lo reportado por otros autores para los mismos sitios (de los Ríos et al., 2016b; Blanco-Rayón et al., 2020). Estos niveles pueden variar entre las temporadas del año, encontrándose mayores concentraciones en invierno (Soto et al., 1995; Franco et al., 2002; Devier et al., 2005). La razón de esto es que durante el invierno los mejillones disminuyen su metabolismo, lo que promueve una depuración más lenta de los metales (Blanco-Rayón et al., 2020). Dado que este estudio se realizó a fines de la primavera y principio del verano, es posible que un mayor metabolismo y altas tasas de depuración sea el motivo por el cual se encontraron niveles de metales inferiores que los previamente reportados en *M. galloprovincialis*.

A pesar que este estudio se realizó durante fines de la primavera y comienzo del verano, temporada en la cual los mejillones presentan un mayor metabolismo y altas tasas de depuración, lo observado en el presente trabajo está en concordancia con una tendencia decreciente de estos compuestos a lo largo de los años (Briaudeau et al., 2019).

**CAPÍTULO 2. Enfoque de múltiples biomarcadores de  
contaminación y respuestas fisiológicas en *Mytilus  
galloprovincialis* en ambientes con distinto tipo de impacto  
antrópico**

## 2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1.1 Respuestas de biomarcadores bioquímicos y de genotoxicidad

#### **Proliferación peroxisomal: actividad de la enzima palmitoil-CoA oxidasa**

De los ejemplares de *M. galloprovincialis* del Grupo 2 (n = 20), una pequeña porción del tejido gonadal fue fijada en NBF 10 % para la determinación de sexos mediante histología en parafina (Ver Sección 2.1.3). La mitad de la glándula digestiva fue pesada, criopreservada en nitrógeno líquido y almacenada en criotubos a -80 °C. Una vez sexados, se seleccionaron las glándulas digestivas de 10 individuos macho de cada sitio de estudio para realizar el análisis bioquímico.

La estimación de la proliferación peroxisomal se hizo a través de la medición de la actividad de la enzima palmitoil-CoA oxidasa (AOX1) de acuerdo a de los Ríos y colaboradores (2013). En resumen, las porciones de glándula digestiva se introdujeron en criotubos que contenían microesferas de sílice y 4 mL de *buffer* de homogenización TVBE (pH 7,6) por cada gramo de glándula digestiva. Las muestras fueron homogenizadas en un homogenizador de tejido (Precellys 24 con unidad Cryolys® Evolution) y los homogenatos fueron transferidos a nuevos tubos eppendorf que fueron luego centrifugados a 500 *xg* durante 15 min a 4 °C. Se recolectaron 100 µL del sobrenadante y se diluyeron en *buffer* TVBE frío en relación 1:5 v/v. El resto del sobrenadante se almacenó a -40 °C para luego medir la concentración de proteína total mediante el método de Bradford (1976) utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

La actividad de AOX1 se determinó espectrofotométricamente a 502 nm a partir de las muestras diluidas de acuerdo a Small y colaboradores (1985). Se realizaron 2 mediciones por muestra que no defirieran más del 10 % y se tomó el valor final como el promedio de ambas mediciones. La actividad de AOX1 fue calculada según la ecuación II.1.

$$\frac{mU\ AOX}{mL} = \frac{\Delta Abs}{min} \times \frac{Vr}{Vm} \times \frac{dilución}{0,091} \quad (\text{Ecuación II.1})$$

Donde:

mU AOX/mL son las unidades de AOX1 por mL

$\Delta\text{Abs}/\text{min}$  es el delta de absorbancia por minuto

$V_r$  es el volumen de reacción

$V_m$  es el volumen de la muestra

dilución es el factor de dilución utilizado

0,091 es el factor de extinción

Finalmente, los resultados se expresaron en relación con la cantidad de proteína de cada muestra por mL como mU AOX1/mg de proteína. Para un mayor detalle de todo el protocolo, ver el Anexo.

### **Análisis transcriptómico**

La otra mitad de la glándula digestiva de *M. galloprovincialis* del Grupo 2 ( $n = 20$ ) fue pesada y almacenada en criotubos con RNAlater a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para el análisis transcriptómico. Una vez sexados, se seleccionaron las glándulas digestivas de 10 individuos macho de cada sitio ya que se han reportado patrones sexo-dependientes en la transcripción de genes de *M. galloprovincialis* (Banni et al., 2011; Duroudier et al., 2019b).

Para la extracción de ARN se utilizaron 10 mg de muestra de glándula digestiva y se utilizó el kit de extracción y purificación miRNasy Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ARN obtenido se realizó a partir de un cuantificador NanoDrop One (Thermo Scientific). La cantidad media de ARN extraído a partir de las muestras de glándula digestiva de los mejillones de Plentzia fue  $1216,76 \pm 690,60$  (ng/ $\mu\text{L}$ , media  $\pm$  de), y de los mejillones de Arriluze de  $827,87 \pm 329,08$  (ng/ $\mu\text{L}$ , media  $\pm$  de). Se verificó que la absorbancia 260/280 fuera mayor que 1,9 y que no hubiera contaminación en las muestras. La evaluación final de la calidad de extracción se realizó a partir de nanochips del Agilent RNA 6000 Nano Kit y el uso de un bioanalizador (Agilent 2100) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN fueron diluidas hasta obtener una concentración de 2  $\mu\text{g}$  por muestra y se realizó la síntesis de ADNc utilizando un kit de síntesis (cDNA Synthesis Agilent kit) siguiendo las instrucciones del fabricante con un termociclador

(SimpleAmp Thermal Cycler). Finalmente, se evaluó la calidad del ADNc utilizando el cuantificador NanoDrop One.

Los genes seleccionados fueron: *cat* (catalasa, respuesta antioxidante), *gstpi* (glutatión-S-transferasa pi 1, metabolismo de biotransformación), *aox1* (palmitoil-CoA oxidasa, marcador de proliferación peroxisomal), y *mt20* (respuesta de exposición a metales). Los niveles de transcripción de los genes fueron cuantificados mediante qRT-PCR usando el colorante SYBR® Green (Roche Diagnostics). Los cebadores específicos para SYBR® Green qRT-PCR se diseñaron a partir de la información de las secuencias de mRNA disponibles en la base de datos de GenBank (NCBI) (Tabla II.9). Los cebadores se diseñaron utilizando el programa libre PRIMER-3 y fueron luego confirmados con el programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems). Cada gen fue amplificado por separado utilizando placas de 384 pocillos y un termociclador en tiempo real ViiA7 de Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific). Las temperaturas de fusión específica, las concentraciones y el factor de dilución utilizado para cada gen se muestran en la Tabla 9.

Los niveles de transcripción relativos se calcularon a partir de la ecuación II.2 (Livak y Schmittgen, 2001) y se calibraron con la media de todas las mediciones del conjunto de Plentzia y Arriluze.

$$RQ = (1 + E)^{-\Delta\Delta Ct} \quad (\text{Ecuación II.2})$$

Donde:

RQ es la cantidad relativa del nivel de transcripción de cada gen en la muestra

E es la eficiencia de amplificación de la reacción de qPCR

$\Delta\Delta Ct$  es la diferencia entre los valores de Ct del gen de interés y los valores de Ct de la curva estándar cuando el logaritmo del número de copias generadas es cero en la muestra

La transcripción relativa de cada gen se normalizó con la concentración de ADNc medida utilizando un kit de cuantificación (Quan-iT Oli Green ssDNA Assay Kit). Finalmente, los resultados se expresaron como el  $\log_2$  RQ.

Para un mayor detalle de todo el protocolo, ver el Anexo.

**Tabla II.9.** Secuencia de nucleótidos de los pares de cebadores específicos directos (Fw) y reversos (Rv) diseñados para los genes diana utilizados para RT-qPCR. Se detallan los números de acceso del GenBank, las temperaturas de fusión específicas (T<sub>m</sub>), las concentraciones de los cebadores y el factor de dilución utilizado.

| Gen           | N° de acceso GenBank | Secuencia 5' 3'                                           | T <sub>m</sub> (°C) | Concentración (pmol/μL) | Factor de dilución |
|---------------|----------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------|-------------------------|--------------------|
| <i>cat</i>    | AY743716.2           | Fw: TCATTACACTTCGACCAGAGACAAC<br>Rv: GGGTTCCACGGTCAGAGAAC | 61                  | 50                      | 1:10               |
| <i>gstpi1</i> | AF527010.1           | Fw: GAAAACTGGAACCAAAGATGCA<br>Rv: TGGAAACCGTCATCATCTGTGT  | 57                  | 100                     | 1:5                |
| <i>aox1</i>   | AF527010             | Fw: ACTACCAGACCCAGCAGTATAGATT<br>Rv: TAAGCTGAGGCTAACAAGGG | 57                  | 50                      | 1:10               |
| <i>mt20</i>   | AY566247.1           | Fw: CAAATGTGCAAGTGGCTGTG<br>Rv: CTTGCAGGAGCATCCAGATT      | 59                  | 100                     | 1:1                |

### **Daño cromosómico del ADN: frecuencia de hialinocitos con micronúcleos y brotes nucleares**

Con una jeringa de 1 mL se extrajo cuidadosamente la mayor cantidad posible de hemolinfa del músculo aductor posterior de los mejillones del Grupo 1 (n = 10). Se tomó una alícuota de 50 μL de hemolinfa y se la diluyó en una solución antiagregante (EDTA salino-acuosa 10 mM) en una relación 1:9 v/v. Luego, 200 μL de la solución de hemolinfa-antiagregante fueron centrifugados a 700 rpm durante 2 min en una citocentrífuga (Cytopro® Cyto centrifuge) y secadas al aire durante 20 min. Se prepararon 2 portaobjetos por muestra que fueron teñidos con un kit comercial Hemacolor® siguiendo las instrucciones del fabricante. Se contaron a ciegas 1000 hialinocitos (hemocitos agranulares) por ejemplar usando un microscopio óptico (Olympus BX50) con un aumento de 100x. Se evaluó la presencia de células con micronúcleos (MN) y otras anomalías nucleares, como las células binucleadas y los brotes nucleares. Los biomarcadores analizados fueron las células con presencia de MN y brotes nucleares de cada ejemplar y los resultados se expresaron en ‰ frecuencias (media ± DE) (Bolognesi y Fenech, 2012). Para un mayor detalle del protocolo ver el Anexo.

## Ruptura de hebras del ADN: Ensayo Cometa

Se realizó el ensayo cometa en los ejemplares del Grupo 1 ( $n = 10$ ) de acuerdo a Raisuddin y Jha (2004) y las modificaciones de Katsumiti y colaboradores (2015). De la extracción de hemolinfa realizada para la evaluación de frecuencia de MN se tomó una alícuota de 250  $\mu\text{L}$  y se la diluyó en solución antiagregante (EDTA salino-acuosa 10 mM) en una relación 1:1 v/v. Luego, 200  $\mu\text{L}$  de la solución hemolinfa-antiagregante fueron centrifugados a 300  $\times g$  durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se mezclaron 180  $\mu\text{L}$  de agarosa de bajo punto de fusión 0,5 % con 20  $\mu\text{L}$  de la solución de hemolinfa y el *pellet* obtenido (volumen final 200  $\mu\text{L}$ ). Se utilizaron portaobjetos Trevigen CometSlide™ de 2 “casilleros” y se prepararon 2 portaobjetos por ejemplar. Cada casillero se pipeteó con 15  $\mu\text{L}$  de la solución obtenida, se ubicaron en una cámara fría oscura a 4 °C durante 10 min y luego en una solución de lisis a 4 °C durante 1 hora. Se lavaron los portaobjetos con agua destilada y se los transfirió al tanque de electroforesis donde fueron incubados en la solución de *buffer* de electroforesis por 20 min. Se realizó la corrida electroforética en el mismo *buffer* durante 30 min (1 V/cm). Al finalizar, se ubicaron los portaobjetos en un *buffer* frío de neutralización por 10 min, se los fijó con metanol a -20 °C durante 3 min en la oscuridad y luego se dejaron secar protegiéndolos de la luz. Los portaobjetos fueron teñidos con el reactivo colorante Safe-Green™, cubiertos con un cubreobjetos y protegidos de la luz durante el resto del análisis. Se los observó a ciegas con un microscopio de fluorescencia (Olympus DP74) y se los fotografió a un aumento de 20x. Se analizaron 100 células seleccionadas al azar utilizando la extensión OpenComet v1.3.1 del programa libre de análisis de imágenes ImageJ. Los resultados se obtuvieron como porcentaje (%) de cola de ADN. Para un mayor detalle del protocolo, ver el Anexo.

## 2.1.2 Respuestas de biomarcadores celulares en la glándula digestiva

### **Análisis autometalográfico para la detección de depósitos metálicos en las células de los túbulos de la glándula digestiva**

Las glándulas digestivas del Grupo 1 (n = 10 por sitio), fueron fijadas en NBF 10 % durante 24 h y luego conservadas en alcohol (etanol) 70° hasta su procesado. Se incluyeron en parafina en un procesador automático de tejido en vacío (Leica ASP300). Posteriormente, se cortaron los bloques de parafina en secciones de 5 µm de espesor utilizando un micrótopo electrónico (Leica® RM 2155) y se las dejó secar durante 24 h en la estufa a 50°C antes de utilizarlas. Para un mayor detalle de todo el procedimiento, ver el Anexo.

Los cortes histológicos fueron tratados con el kit *silver enhancing reagent* de AURION® (R-Gent SE-LM) como se detalló en la Sección I, Capítulo 2 (2.1.2 Respuesta de biomarcadores celulares en glándula digestiva).

## 2.1.3 Respuestas de biomarcadores tisulares en la glándula digestiva y tejido gonadal

Para el análisis de las respuestas de biomarcadores tisulares en glándula digestiva y tejido gonadal, los cortes histológicos del Grupo 1 y Grupo 2 (n = 20 por sitio) fueron teñidos con hematoxilina-eosina (H-E). Para ello, se utilizó un teñidor robótico (Leica autostainer XL) con máquina de portaobjetos incorporado (Leica CV5030). En resumen, las secciones se desparafinaron en xileno y luego se hidrataron en distintas series de alcohol. Posteriormente, se tiñeron con hematoxilina, luego con eosina y se deshidrataron en alcohol. Finalmente se aclararon en xileno y se montaron con DPX. Para un mayor detalle del protocolo, ver el Anexo.

### **Análisis morfométrico de los túbulos digestivos**

La cuantificación de los cambios en la morfología de los túbulos digestivos se realizó estudiando distintos parámetros planimétricos de acuerdo a Bignell y colaboradores (2012).

Los cortes histológicos teñidos con H-E (Grupo 1, n = 10 por sitio) fueron analizados como se detalló en la Sección I, Capítulo 2 (2.1.3 Respuestas de biomarcadores tisulares en la glándula digestiva y tejido gonadal).

### **Análisis estereológico de la composición celular e integridad del tejido digestivo**

El volumen en densidad de las células basófilas (VvBAS) en la glándula digestiva se analizó de acuerdo a Bignell y colaboradores (2012). Se utilizaron las fotografías de la glándula digestiva de los cortes teñidos con H-E tomadas para el análisis morfométrico de los túbulos digestivos (n = 10 por sitio) y se utilizó el programa STEPanizer1 (Tschanz et al., 2011), como se detalló en la Sección I, Capítulo 2 (2.1.3 Respuestas de biomarcadores tisulares en la glándula digestiva y tejido gonadal).

### **Análisis histopatológico en glándula digestiva y tejido gonadal**

Los cortes histológicos del Grupo 1 (n = 10 por sitio) que fueron teñidos con H-E se observaron al microscopio óptico (AXIOPLAN 2 Zeiss ®) y se analizó la presencia de alteraciones tanto en la glándula digestiva como en el tejido gonadal de cada individuo. Se analizó la presencia de las alteraciones histopatológicas a partir de una escala semicuantitativa de acuerdo a Kim y colaboradores (2006) y se calcularon la prevalencia (P) e intensidad (I) como se detalló en la Sección I, Capítulo 2 (2.1.3 Respuestas de biomarcadores tisulares en la glándula digestiva y tejido gonadal).

### **Parasitosis**

En los mismos cortes utilizados anteriormente, se analizó la presencia de parásitos como se detalló en la Sección I, Capítulo 2 (2.1.3 Respuestas de biomarcadores tisulares en la glándula digestiva y tejido gonadal). Finalmente, se calculó la P acumulada, como la sumatoria de todas las infecciones parasitarias para cada sitio en glándula digestiva y tejido gonadal.

## **Índice histopatológico en glándula digestiva y tejido gonadal**

Se calculó un índice cuantitativo de condición histopatológica (IH) (Costa et al., 2011, 2013; Cuevas et al., 2015) como se detalló en la Sección I, Capítulo 2 (2.1.3 Respuestas de biomarcadores tisulares en la glándula digestiva y tejido gonadal).

## **2.1.4 Respuestas fisiológicas**

### **Desarrollo gametogénico e índice gonadal**

Se calculó la frecuencia de sexos y se estudiaron los estadios de desarrollo gametogénico en machos y hembras de los ejemplares del Grupo 1 (n = 10) y Grupo 2 (n = 20). Se establecieron cinco estadios de desarrollo gametogénico, en base a lo descrito por Seed (1969) para mitílidos con algunas modificaciones:

Reposo: inactivo o indiferenciado.

Desarrollo: comienza la gametogénesis, se observan algunas gametas maduras.

Maduro: acinos repletos de gametas maduras.

Puesta: emisión activa de gametas, en algunos acinos se observa el lumen.

Post-puesta: acinos vacíos, se observan algunas gametas residuales.

Se calculó, además, el índice gonadal (IG) de cada ejemplar dependiendo de su estadio de desarrollo gametogénico, como se detalló en la Sección I, Capítulo 2 (2.1.4 Respuestas fisiológicas).

### **Índice de condición**

Se determinó el índice de condición (IC) de los individuos de *M. galloprovincialis* del Grupo 3 para cada sitio de estudio. Para ello, 20 individuos fueron pesados con una balanza de precisión (Sartorius CP225D) antes y después de que las valvas y el biso fueran separados de la masa visceral. El IC se calculó de acuerdo a Damiens y colaboradores (2007) como se detalló en la Sección I, Capítulo 2 (2.1.4 Respuestas fisiológicas).

### 2.1.5 Integración de las distintas respuestas biológicas

Se calculó, para cada sitio, el índice integral de respuestas biológicas (IBR) a partir de las respuestas biológicas que presentaron diferencias significativas en cada nivel de organización estudiado. El IBR se calculó como se detalló en la Sección I, Capítulo 2 (2.1.5 Integración de las distintas respuestas biológicas). Dado que el valor del IBR depende de la cantidad de respuestas biológicas analizadas en el conjunto de datos, se dividió el valor de IBR obtenido por el número de respuestas utilizadas para calcular IBR/n (Brooks et al., 2011; Marigómez et al., 2013a).

### 2.1.6 Análisis estadísticos

Todos los parámetros fueron analizados para determinar si había diferencias estadísticamente significativas entre los valores de cada sitio. Se estableció un nivel de significancia del 95 % ( $p < 0,05$ ) y se utilizó el programa STATISTICA 13 (StatSoft, Inc.). Se verificaron los supuestos de normalidad a partir de la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de las varianzas a partir de la prueba de Levene y en caso de cumplirse estos supuestos, se utilizó la prueba paramétrica t de Student para las comparaciones por pares (niveles de transcripción de *cat*, *aox1*, *mt20*; frecuencia de MN y brotes nucleares; % cola ADN; MLR/MET y MET/MDR; IH). En aquellos casos que no se cumplieron los supuestos incluso aplicando una transformación logarítmica al conjunto de datos, se procedió a realizar un análisis no paramétrico de Mann-Whitney U test (niveles de transcripción de *gstpi1*; actividad de AOX1; VvBAS; CTD) para evaluar las diferencias entre los sitios.

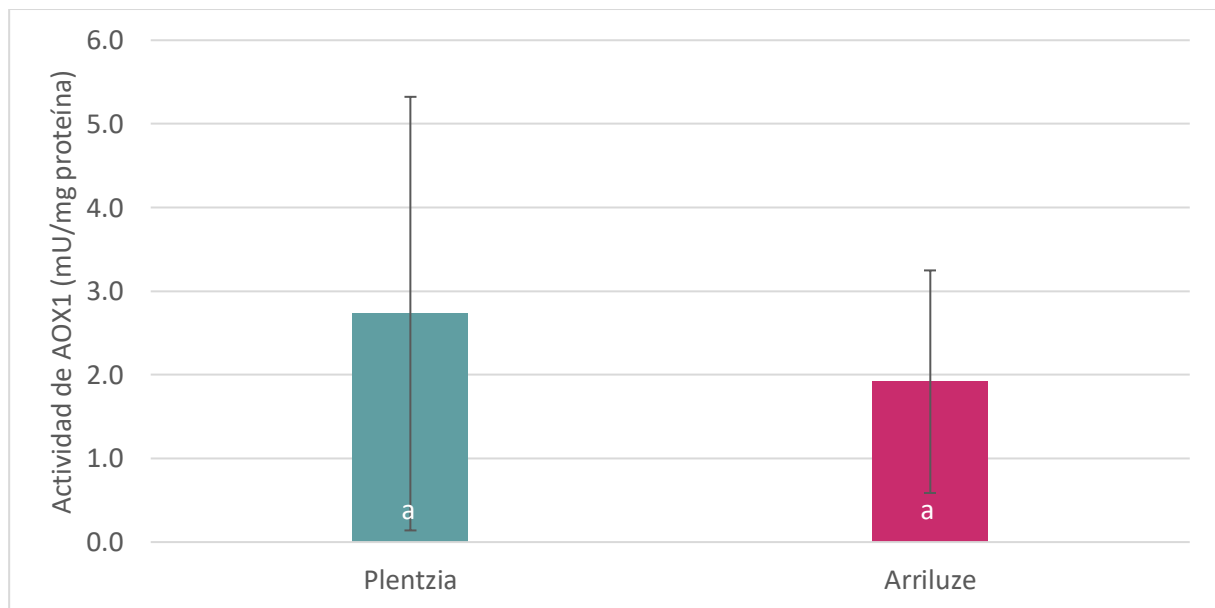
La frecuencia de sexos fue analizada mediante la prueba estadística de Chi cuadrado ( $\chi^2$  test,  $p < 0,05$ ) para determinar si las frecuencias observadas eran las mismas que las frecuencias esperadas para la especie (1:1).

## 2.2 RESULTADOS

### 2.2.1 Respuestas de biomarcadores bioquímicos y de genotoxicidad

#### Proliferación peroxisomal: actividad de la enzima palmitoil-CoA oxidasa

Algunas muestras debieron ser descartadas debido al daño ocasionado por un desperfecto en el protocolo. Por este motivo, el n final fue de 6 muestras para Plentzia y 7 para Arriluze. El valor de actividad de la enzima palmitoil-CoA oxidasa (AOX1) (mU/mg proteína) fue de  $2,73 \pm 2,59$  (media  $\pm$  DE) en los ejemplares recolectados en Plentzia y de  $1,92 \pm 1,33$  (media  $\pm$  DE) en los ejemplares recolectados en Arriluze. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los sitios (Figura II.5, Mann-Whitney;  $U = 18$ ;  $p > 0,05$ ).

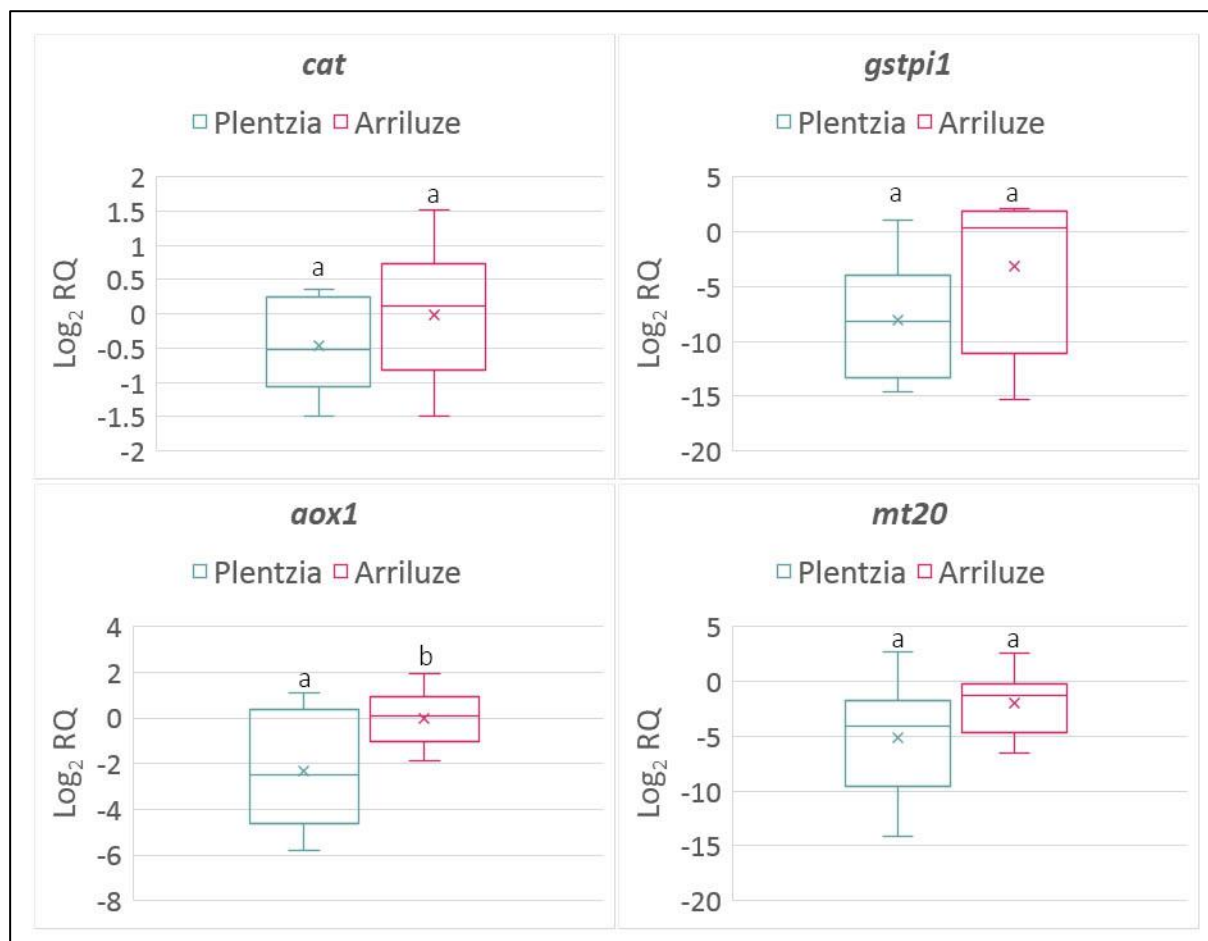


**Figura II.5.** Actividad enzimática de AOX1 (mU A/mg proteína) en ejemplares de *Mytilus galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze (media  $\pm$  DE). Letras distintas representa diferencias significativas entre los sitios ( $p < 0,05$ ).

#### Análisis transcriptómico

No se observaron diferencias significativas en los niveles de transcripción de los genes *cat* (Figura II.6, test de t;  $t = 1,24$ ;  $p > 0,05$ ), *gstpi* (Figura II.6, Mann-Whitney;  $U = 29$ ;  $p >$

0,05) y *mt20* (Figura II.6, test de t;  $t = 1,62$ ;  $p > 0,05$ ). Los niveles de transcripción del gen *aox1* fueron significativamente mayores en los ejemplares de Arriluze que en los de Plentzia (Figura II.6, test de t;  $t = 5,58$ ;  $p < 0,05$ ).

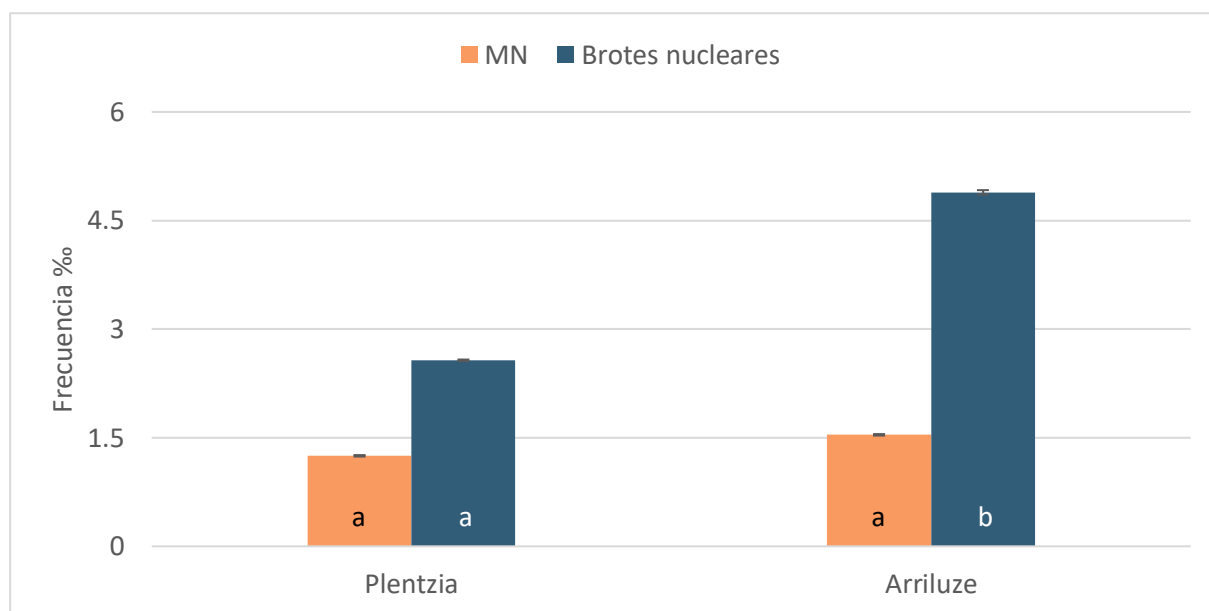


**Figura II.6.** Niveles de transcripción (expresados como  $\log_2$  de cantidad relativa RQ con respecto al conjunto Plentzia y Arriluze) de los genes *cat*, *gstpi1*, *aox1*, y *mt20* en la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze. Los diagramas de cajas y bigotes que muestran el valor de la mediana (línea horizontal), los cuartiles 25 %-75 % (caja) y el desvío estándar (bigotes). Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios ( $p < 0,05$ ).

### **Daño cromosómico del ADN: frecuencia de hialinocitos con micronúcleos y brotes nucleares**

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de micronúcleos (MN) de los ejemplares recolectados en Plentzia ( $1,25 \pm 0,01 \text{ ‰}$ ) y Arriluze ( $1,54 \pm 0,01 \text{ ‰}$ ) (media  $\pm$  DE) (Figura II.7, test de t;  $t = 0,59$ ;  $p > 0,05$ ). Sin embargo, se observaron

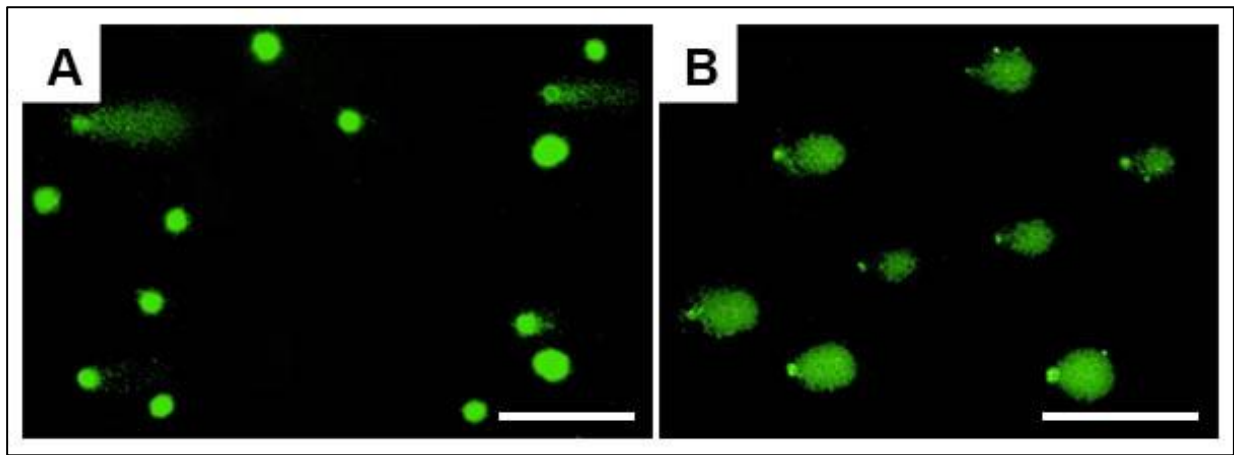
diferencias significativas en la frecuencia de brotes nucleares presentes en los hialinocitos de los mejillones, esta frecuencia fue menor en Plentzia ( $2,57 \pm 0,01 \text{ ‰}$ ) que en Arriluze ( $4,89 \pm 0,03 \text{ ‰}$ ) (media  $\pm$  DE) (Figura II.7, test de t;  $t = 2,30$ ;  $p < 0,05$ ).



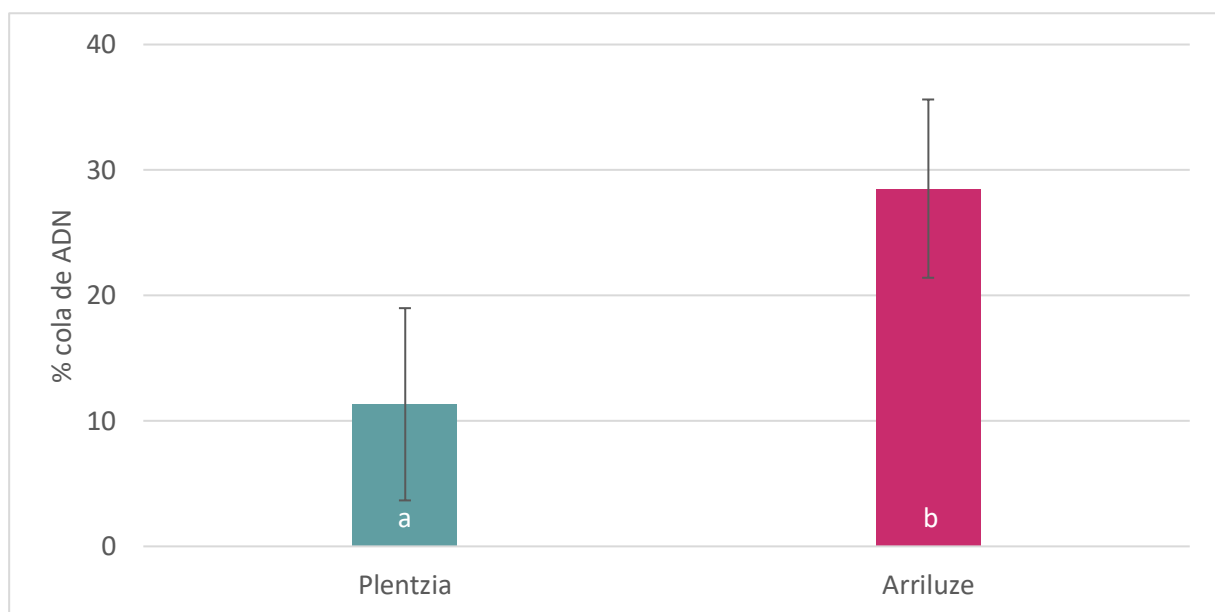
**Figura II.7.** Frecuencia de hialinocitos con micronúcleos (MN) y brotes nucleares (‰) en ejemplares de *Mytilus galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze (media  $\pm$  DE). Letras distintas del mismo color representan diferencias significativas entre los sitios ( $p < 0,05$ ).

### Ruptura de hebras del ADN: Ensayo Cometa

En la Figura II.8 se representan algunas imágenes del ensayo. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de la cola de ADN de los hemocitos del ensayo cometa. El valor de %cola ADN de los ejemplares recolectados en Plentzia ( $11,32 \pm 7,66$ ) menor que el de los ejemplares de Arriluze ( $28,51 \pm 7,10$ ) (media  $\pm$  DE). (Figura II.9, Mann-Whitney;  $U = 3,67$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura II.8.** Micrografías de fluorescencia con resultados típicos del nivel de ruptura de hebras del ADN en los hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* de **A.** Plentzia y **B.** Arriluze. Ensayo Cometa. Escala: 100  $\mu$ m.



**Figura II.9.** Valores de la cola de ADN (%cola ADN) en los hemocitos de ejemplares de *Mytilus galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze (media  $\pm$  DE). Letras distintas representa diferencias significativas entre los sitios ( $p < 0,05$ ).

## 2.2.2 Respuestas de biomarcadores celulares en la glándula digestiva

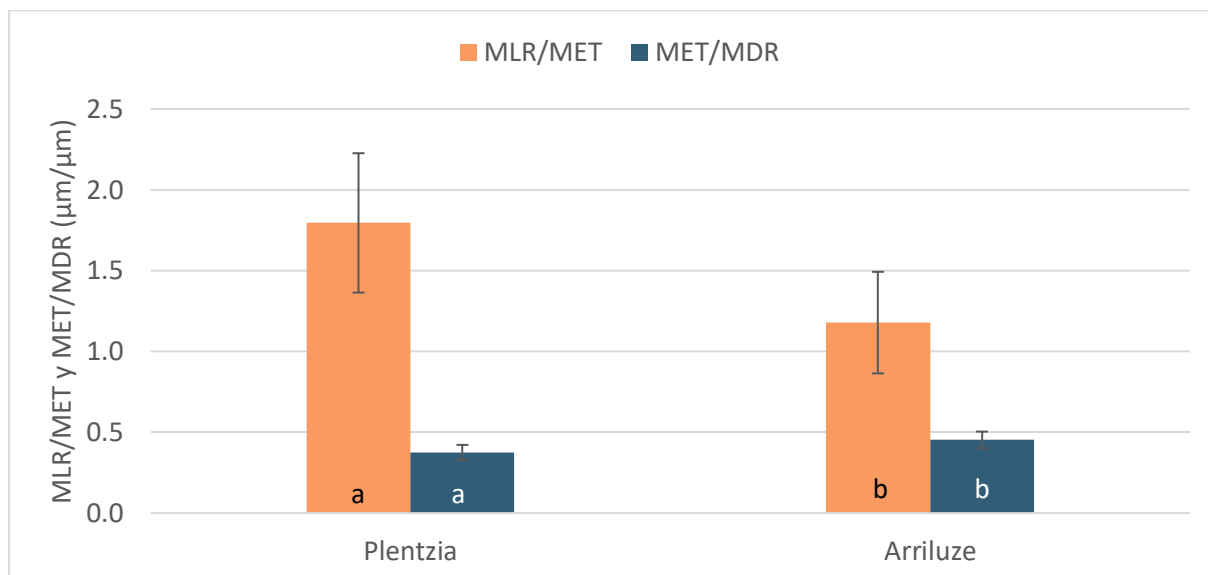
### **Análisis autometalográfico para la detección de depósitos metálicos en las células de los túbulos de la glándula digestiva**

Se realizaron distintas pruebas con el *kit silver enhancing reagent* de AURION® (R-Gent SE-LM) y se corroboró que el *kit* es sensible para detección de depósitos metálicos en cortes histológicos de muestras de individuos de *Mytilus galloprovincialis* (utilizadas como control positivo) que previamente fueron expuestos a metales en un experimento con plata (Jimeno-Romero et al., 2017) (ver Sección I, Capítulo 2. Figura I.15). Sin embargo, el *kit* no fue sensible en la detección de depósitos metálicos en las muestras de *M. galloprovincialis* obtenidas en este estudio. Por lo tanto, no se realizó la cuantificación intracelular de BSD (VvBSD) en las células digestivas.

## 2.2.3 Respuestas de biomarcadores tisulares en glándula digestiva y tejido gonadal

### **Análisis morfométrico de los túbulos digestivos**

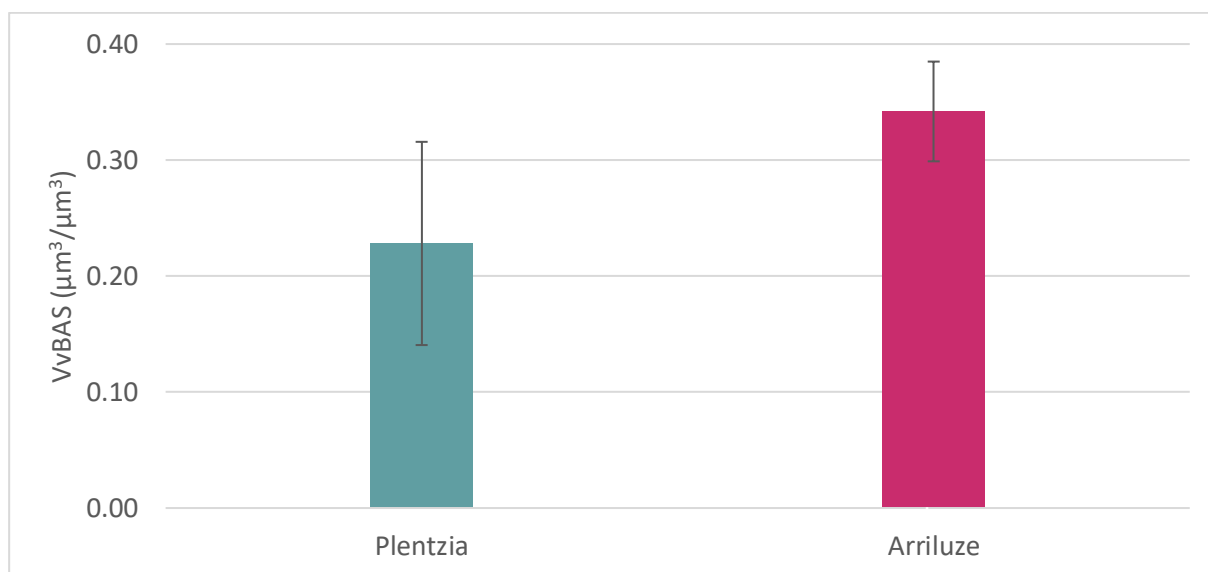
El valor de MLR/MET (media  $\pm$  DE) fue significativamente mayor en los ejemplares recolectados en Plentzia ( $1,80 \pm 0,43 \mu\text{m}/\mu\text{m}$ ) que en los ejemplares de Arriluze ( $1,18 \pm 0,31 \mu\text{m}/\mu\text{m}$ ) (Figura II.10, test de t;  $t = 3,66$ ;  $p < 0,05$ ). Además, el valor de MET/MDR fue significativamente menor en los ejemplares recolectados en Plentzia ( $0,38 \pm 0,05 \mu\text{m}/\mu\text{m}$ ) que en los ejemplares de Arriluze ( $0,45 \pm 0,05 \mu\text{m}/\mu\text{m}$ ) (Figura II.10, test de t;  $t = 3,54$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura II.10.** Valores de las relaciones MLR/MET y MET/MDR ( $\mu\text{m}/\mu\text{m}$ ) de los túbulo digestivos de ejemplares de *Mytilus galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze (media  $\pm$  DE). Letras distintas y del mismo color representa diferencias significativas entre los sitios ( $p < 0,05$ ).

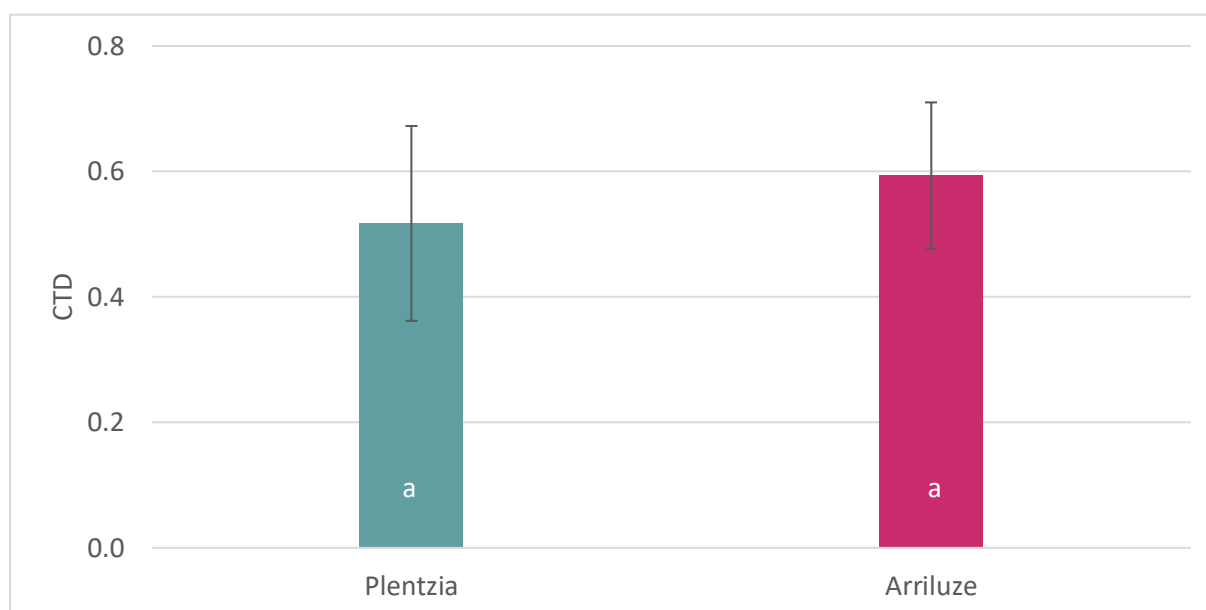
### Análisis estereológico de la composición celular e integridad del tejido digestivo

Al analizar la composición celular de los túbulo digestivos se observaron diferencias significativas en los valores de la densidad en volumen de células basófilas siendo el VvBAS de los ejemplares recolectados en Plentzia ( $0,23 \pm 0,09 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$ ) menor que en Arriluze ( $0,34 \pm 0,04 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$ ) (media  $\pm$  de) (Figura 12, test de t;  $t = 3,69$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura II.11.** Volumen de células basófilas VvBAS ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$ ) de los túbulo digestivos de ejemplares de *Mytilus galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze (media  $\pm$  DE). Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios ( $p < 0,05$ ).

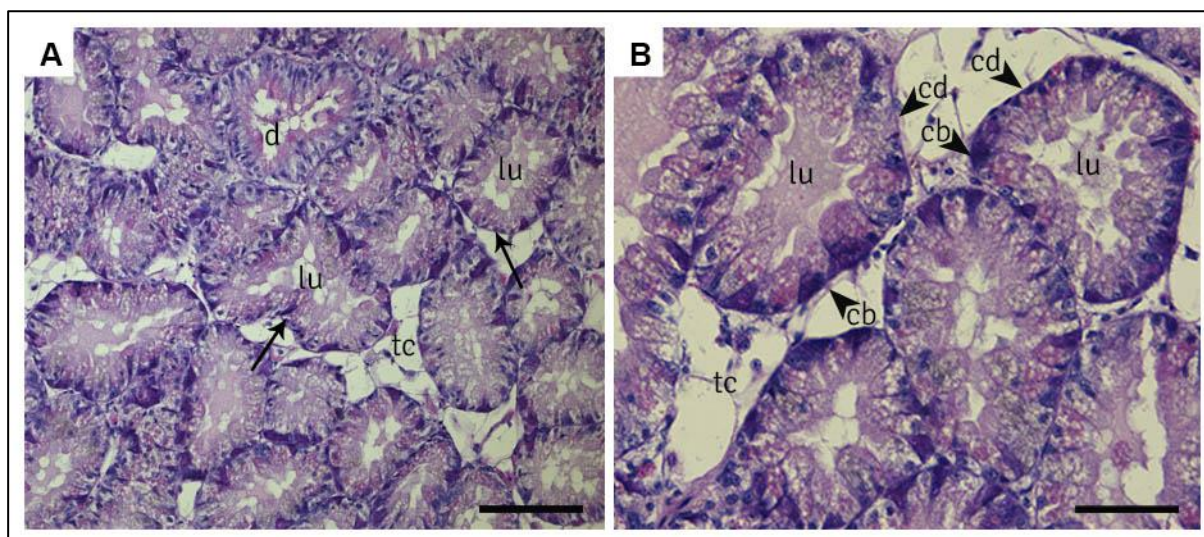
En el análisis de la relación CTD, no se observaron diferencias significativas entre el valor de CTD de los ejemplares recolectados en Plentzia ( $0,052 \pm 0,16$ ) y en Arriluze ( $0,59 \pm 0,12$ ) (media  $\pm$  DE) (Figura II.12, Mann-Whitney;  $U = 34$ ;  $p > 0,05$ ).



**Figura II.12.** Valores de la relación CTD de los túbulos digestivos de ejemplares de *Mytilus galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze (media  $\pm$  DE). Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios ( $p < 0,05$ ).

### **Daños histológicos en glándula digestiva**

La glándula digestiva de los ejemplares de *M. galloprovincialis* analizados presentó las características propias de los bivalvos descritas por Yonge (1926). En resumen, la glándula está compuesta por numerosos túbulos digestivos que terminan en acinos ciegos. Estos túbulos se ramifican desde un divertículo que se abre desde el estómago y, en un corte transversal, los túbulos de la glándula digestiva son circulares u ovalados con un lumen angosto (Figura II.13). El epitelio de los túbulos consta de una capa simple con dos tipos celulares: las células digestivas y las células basófilas. El espacio intertubular está formado por escaso tejido conectivo por el cual circulan los hemocitos (Figura II.13).



**Figura II.13.** Micrografías de secciones histológicas de la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis*. **A.** Vista general de un corte transversal de la glándula digestiva donde se observan, entre el tejido conectivo (tc), un divertículo (d) y numerosos túbulos digestivos (flecha) con lumen (lu) de tamaño variable. **B.** Detalle de los túbulos digestivos con células digestivas (cd) y células basófilas (cb). Tinción: hematoxilina-eosina. Escala: A: 100  $\mu$ m, B: 50  $\mu$ m.

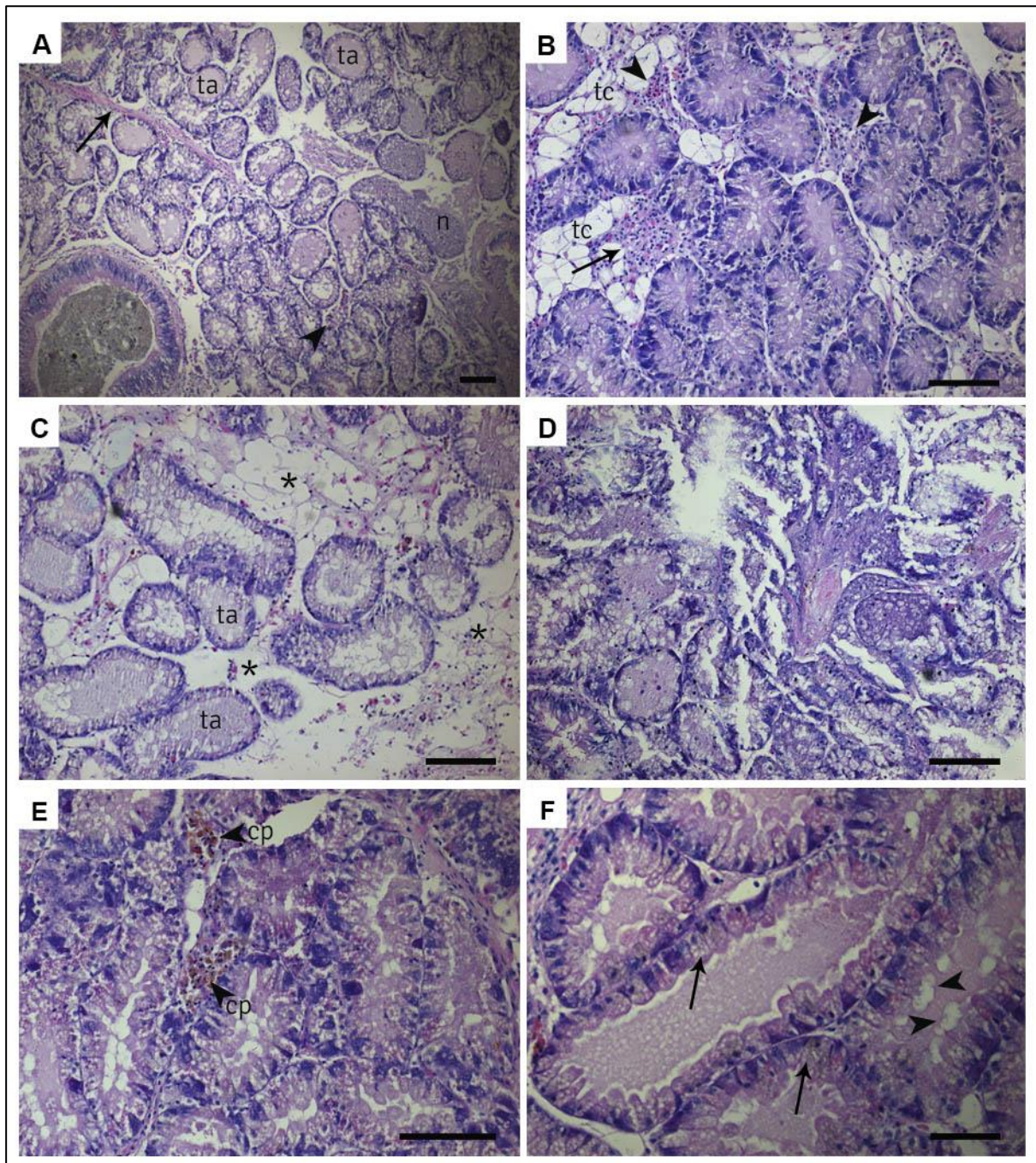
La prevalencia e intensidad media (y la prevalencia acumulada) de las alteraciones histopatológicas observadas en la glándula digestiva de los ejemplares recolectados en Plentzia y Arriluze, se representan en la Tabla II.11.

**Tabla II.11.** Prevalencia (%), intensidad media (basada en la escala semicuantitativa) y prevalencia acumulada de alteraciones histopatológicas en la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis* en Plentzia y Arriluze. (0 = sin alteración; valores aproximados a: 1 = intensidad leve; 2 = intensidad moderada y 3 = intensidad alta).

| Alteración histopatológica               | Prevalencia (%) |            | Intensidad |          |
|------------------------------------------|-----------------|------------|------------|----------|
|                                          | Plentzia        | Arriluze   | Plentzia   | Arriluze |
| Infiltración hemocítica                  | 90              | 90         | 1,6        | 1,4      |
| Aumento del espacio intertubular         | 90              | 80         | 1,7        | 1,4      |
| Células pigmentadas en tejido conectivo  | 100             | 50         | 1,4        | 1,2      |
| Agregados simil-lipofuscinas             | 50              | 50         | 1,0        | 1,2      |
| Hipervacuolización de células digestivas | 80              | 50         | 1,6        | 1,2      |
| Hiperplasia de células basófilas         | 60              | 80         | 1,5        | 2,1      |
| Granulocitoma                            | 30              | 50         | 1,0        | 1,2      |
| Fibrosis                                 | 80              | 70         | 1,3        | 1,1      |
| Atrofia del epitelio                     | 100             | 80         | 1,7        | 1,0      |
| Necrosis                                 | 80              | 100        | 1,3        | 1,3      |
| <b>Prevalencia acumulada</b>             | <b>760</b>      | <b>700</b> |            |          |

Se observó que, en ambos sitios, las tres alteraciones más abundantes fueron la infiltración hemocítica en el espacio intertubular, la atrofia del epitelio digestivo y la necrosis (Figura II.14 A). La alta prevalencia de infiltración hemocítica difusa (90 %), fue de intensidad moderada en los ejemplares de ambos sitios y se caracterizó por el aumento de hemocitos hialinocitos y granulocitos en el tejido intertubular (Figura II.14 B). La atrofia del epitelio digestivo, caracterizada por un aumento del lumen y una reducción de la altura del epitelio de los túbulos (Figura II.14 C), fue mayor en los ejemplares recolectados en Plentzia, con una prevalencia del 100 % e intensidad moderada; mientras en los ejemplares de Arriluze, si bien también su prevalencia fue alta (80 %), la intensidad fue leve. La necrosis, caracterizada por la degradación del tejido y descomposición celular, se observó en el 100 % de los ejemplares de Arriluze y en el 80 % en los ejemplares de Plentzia, con intensidad moderada en ambos casos (Figura II.14 A, D). La siguiente alteración con alta prevalencia en ambos sitios, fue el aumento del espacio intertubular, que consistió principalmente en la desorganización intersticial del tejido conectivo (Figura II.14 C). Su prevalencia fue mayor en los ejemplares recolectados en Plentzia (90%) que en los ejemplares recolectados en Arriluze (80 %) y la intensidad fue moderada en ambos casos. La fibrosis, también se observó con una prevalencia mayor en los ejemplares recolectados en Plentzia (80%) que en los ejemplares recolectados en Arriluze (70 %) y la intensidad fue moderada en ambos casos (Figura II.14 A). En el tejido conectivo se observó la presencia de células pigmentadas, de tamaño y forma similar a los granulocitos, pero de color ocre anaranjado (Figura II.14 E). Su intensidad fue moderada en los ejemplares de ambos sitios, pero en Plentzia se las observó en todos los individuos analizados (100 %) y en Arriluze en el 50 % de los casos. La hiperplasia de células basófilas, es decir, el aumento del número de este tipo celular (Figura II.14 F), fue mucho mayor en los ejemplares recolectados en Arriluze que en los de Plentzia. La prevalencia (80 %) e intensidad fueron altas en los ejemplares de Arriluze mientras que en los de Plentzia la prevalencia fue del 60 %, y la intensidad moderada. Se observó, además hipervacuolización en las células digestivas, caracterizada por un aumento en la cantidad y el volumen de vacuolas en las células digestivas (Figura II.14 F). La prevalencia de esta alteración fue mucho mayor en los ejemplares recolectados en Plentzia (80 %) que en los de Arriluze (50 %) y la

intensidad fue moderada en ambos sitios. Los agregados simil-lipofuscinas se observaron como agregados citoplasmáticos de color marrón (Figura II.14 F), y tuvieron una prevalencia media del 50 % en los ejemplares de ambos sitios, con intensidad moderada. Por último, la presencia de granulocitomas, observados como agregados de granulocitos en el tejido conectivo (Figura II.14 B), fue mayor en los ejemplares recolectados en Arriluze. Su prevalencia media fue del 50 % y su intensidad moderada, mientras que en los ejemplares de Plentzia si bien la prevalencia fue del 30 %, la intensidad fue leve. La prevalencia acumulada de las distintas alteraciones histopatológicas en la glándula digestiva fue del 760 % en los ejemplares de Plentzia y de 700 % en los ejemplares recolectados en Arriluze (Tabla II.11).



**Figura II.14.** Micrografías de secciones histológicas transversales de la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis* con distintas alteraciones histopatológicas. **A.** Vista general donde se observan túbulos atrésicos (ta), fibrosis (flecha), un gran sector con necrosis (n) y un pequeño sector con infiltración hemocítica difusa (punta de flecha). **B.** Detalle de infiltración hemocítica difusa (punta de flecha) en el tejido conectivo (tc). Nótese la presencia de un pequeño granulocitoma (flecha). **C.** Túbulos digestivos atrofiados (ta) y aumento del espacio intertubular (asterisco). **D.** Ejemplar en donde la mayoría de los túbulos están necrosados. **E.** Células pigmentadas (cp) color ocre anaranjado en el espacio intertubular. **F.** Detalle de los túbulos digestivos con hiperplasia de células basófilas, que además presentan agregados simil-lipofuscinas (flecha) e hipervacuolización de células digestivas (punta de flecha). Tinción: hematoxilina-eosina. Escalas: A-E: 100 µm; F: 50 µm.

## Daños histológicos en tejido gonadal

El tejido gonadal de los ejemplares de *M. galloprovincialis* analizados, presentó las características propias del género *Mytilus*, previamente descrito en otros trabajos (Bouxin, 1956; Seed, 1969). En resumen, a medida que se desarrolla, se forman los acinos que van ocupando el manto y pueden invadir los demás tejidos hasta alcanzar su tamaño máximo previo a la puesta de las gametas. Para una mayor descripción del tejido gonadal, ver 2.2.4 Repuestas fisiológicas (Desarrollo gametogénico e índice gonadal) en este capítulo.

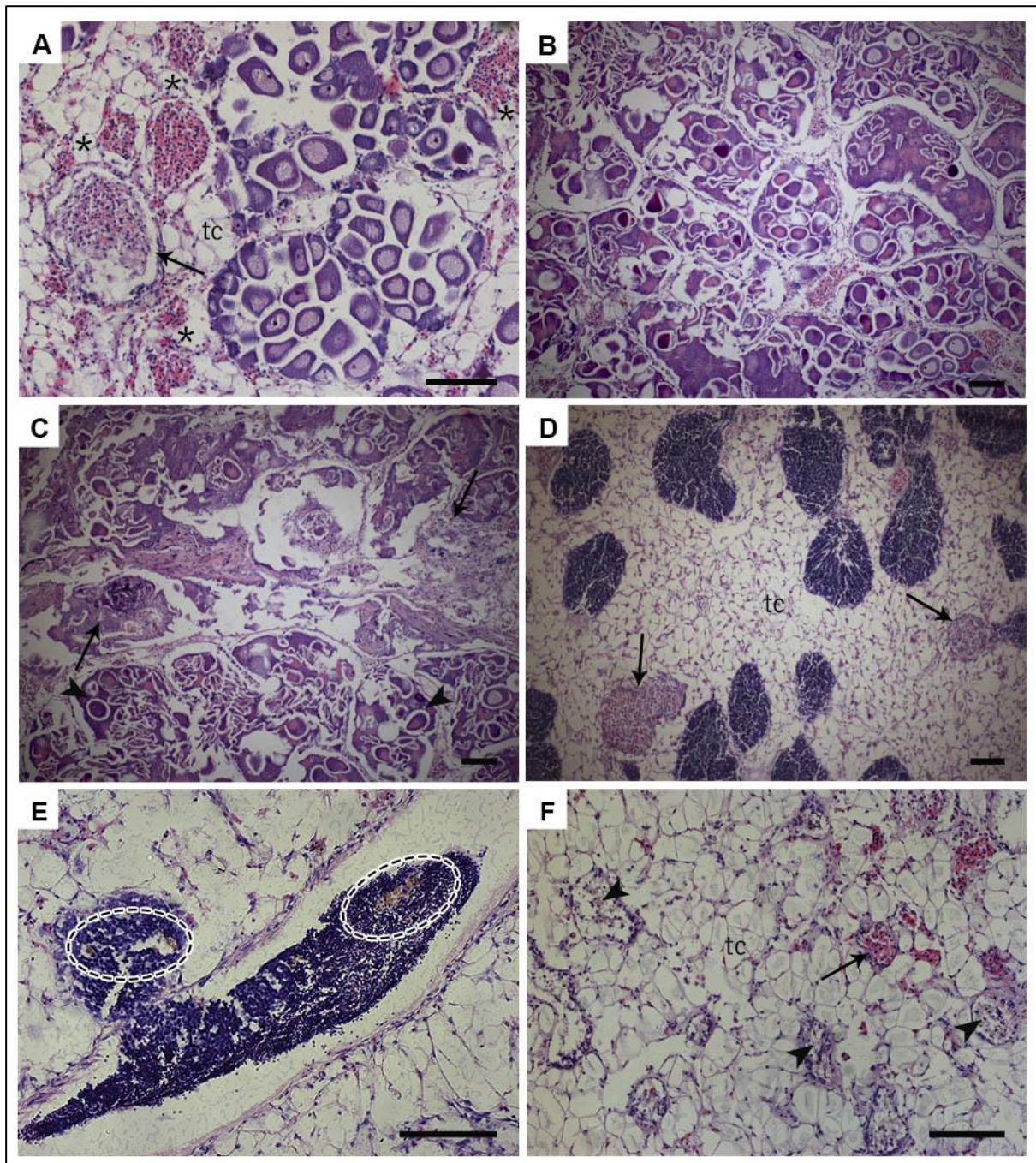
La prevalencia e intensidad media y la prevalencia acumulada de las alteraciones histopatológicas observadas en el tejido gonadal de los ejemplares recolectados en los sitios de estudio se representan en la Tabla II.12.

**Tabla II.12.** Prevalencia (%), intensidad media y prevalencia acumulada de alteraciones histopatológicas en el tejido gonadal de *Mytilus galloprovincialis* en Plentzia y Arriluze. (0 = sin alteración; valores aproximados a: 1 = intensidad leve; 2 = intensidad moderada y 3 = intensidad alta).

| Alteración histopatológica    | Prevalencia |            | Intensidad |          |
|-------------------------------|-------------|------------|------------|----------|
|                               | Plentzia    | Arriluze   | Plentzia   | Arriluze |
| Infiltración hemocítica       | 80          | 40         | 1,4        | 1,8      |
| Células pigmentadas en acinos | 0           | 10         | 0          | 1,0      |
| Agregados simil-lipofuscinas  | 0           | 10         | 0          | 1,0      |
| Granulocitoma                 | 40          | 50         | 1,8        | 1,2      |
| Fibrosis                      | 0           | 0          | 0          | 0        |
| Atresia oocitaria             | 60          | 40         | 1,8        | 1,5      |
| Necrosis                      | 60          | 40         | 1,5        | 1,0      |
| <b>Prevalencia acumulada</b>  | <b>240</b>  | <b>190</b> |            |          |

Se observó que, en ambos sitios, las alteraciones más abundantes en el tejido gonadal fueron la infiltración hemocítica, la presencia de granulocitomas, la atresia oocitaria en hembras y la necrosis. Las células pigmentadas en los acinos y los agregados simil-lipofuscinas estuvieron presentes únicamente en algunos ejemplares recolectados en Arriluze. No se observó en ninguno de los dos sitios la presencia de fibrosis (Tabla II.12, Figura II.15). La infiltración hemocítica, observada tanto en el tejido conectivo como en el interior de

los acinos (Figura II.15 A, D, F), presentó una mayor prevalencia en los ejemplares de Plentzia (80 %) que en los de Arriluze (40 %) con una intensidad moderada en ambos casos. La atresia oocitaria (Figura II.15 B, C), se observó en el 60 % de los ejemplares recolectados en Plentzia y en el 40 % en Arriluze, en ambos casos con intensidad moderada. En algunos casos, la atresia se vio asociada a la necrosis y se caracterizó por la ruptura celular y desintegración del tejido (Figura II.15 C). Se presentó con mayor prevalencia en Plentzia (60 %) que en Arriluze (40 %), con intensidad moderada y leve, respectivamente. La presencia de granulocitomas, se observó cómo agregados de granulocitos (Figura II.15 D) y su prevalencia fue similar en ambos sitios ( $P_{\text{Plentzia}} = 40 \%$ ,  $P_{\text{Arriluze}} = 50 \%$ ) con intensidad moderada. En Arriluze, se observaron baja prevalencia de células pigmentadas y agregados simil-lipofuscinas (10 %), con intensidad leve. Las células pigmentadas se observaron dentro de los acinos y se caracterizaron por ser de tamaño pequeño, similar a los granulocitos, pero de color ocre o marrón (Figura II.15 E). Los agregados simil-lipofuscinas, se observaron como residuos amarillentos amarronados en un ejemplar macho que ya había realizado la puesta de gametas (Figura II.15 F). La prevalencia acumulada de las distintas alteraciones histopatológicas en tejido gonadal fue del 240 % en los ejemplares de Plentzia y del 190 % en los ejemplares recolectados en Arriluze (Tabla II.12).



**Figura II.15.** Micrografías de secciones histológicas transversales del tejido gonadal de machos y hembras de *Mytilus galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze con distintas alteraciones histopatológicas. **A.** Infiltración hemocítica (asteriscos) en tejido conectivo (tc) y dentro de un acino femenino (flecha). **B.** Atresia oocitaria. **C.** Tejido gonadal necrótico (flecha) y atresia (punta de flecha). **D.** Granulocitomas (flecha) en el tejido conectivo (tc) de un macho. **E.** Células pigmentadas (elipse) dentro de acinos masculinos. **F.** Tejido conectivo (tc) con acinos masculinos post-puesta con restos de agregados simil-lipofuscinas color ocre-marrón (punta de flecha) en su interior. Nótese la presencia de acinos con hemocitos en su interior (flecha). Tinción: hematoxilina-eosina. Escala: A-F: 100  $\mu$ m.

## Parasitosis

En la glándula digestiva se detectó la presencia de cuatro tipos distintos de parásitos mientras que en el tejido gonadal se observó solo un tipo (Figura II.16). La prevalencia e intensidad media de los distintos organismos observados en ambos tejidos se muestran en la Tabla II.13.

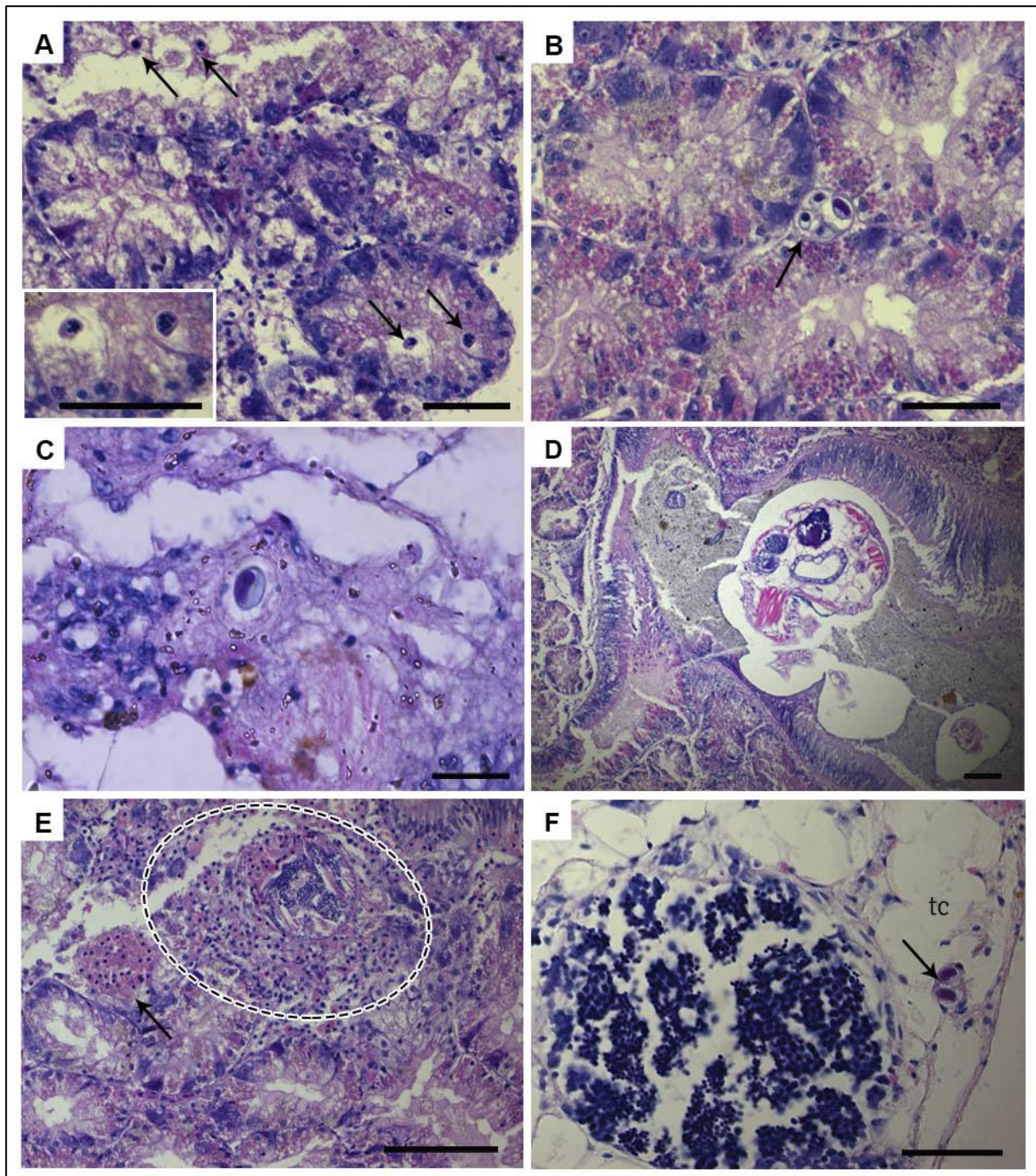
**Tabla II.13.** Prevalencia (%), intensidad media (basada en la escala semicuantitativa) y prevalencia acumulada de parásitos en la glándula digestiva y tejido gonadal de *Mytilus galloprovincialis* en Plentzia y Arriluze. (0 = sin alteración; valores aproximados a: 1 = intensidad leve; 2 = intensidad moderada y 3 = intensidad alta).

| Parasitosis                  | Prevalencia |            | Intensidad |          |
|------------------------------|-------------|------------|------------|----------|
|                              | Plentzia    | Arriluze   | Plentzia   | Arriluze |
| <b>Glándula digestiva</b>    |             |            |            |          |
| Ciliados                     | 100         | 100        | 2,1        | 1,6      |
| <i>Nematopsis</i> sp.        | 100         | 10         | 2,2        | 1        |
| <i>Mytilicola</i> sp.        | 10          | 20         | 1          | 1        |
| Otros parásitos              | 0           | 10         | 0          | 1        |
| <b>Prevalencia acumulada</b> | <b>210</b>  | <b>140</b> |            |          |
| <b>Tejido gonadal</b>        |             |            |            |          |
| <i>Nematopsis</i> sp.        | 70          | 0          | 1          | 0        |
| <b>Prevalencia acumulada</b> | <b>70</b>   | <b>0</b>   |            |          |

En los ejemplares de ambos sitios se observó la presencia de ciliados sin identificar, con pequeños micronúcleos en su interior. Se encontraron principalmente dentro de las células digestivas (Figura II.16 A), y ocasionalmente dentro del lumen de los túbulos o en el tejido conectivo cercano a los túbulos. La prevalencia de ciliados fue del 100 % en los ejemplares de ambos sitios, aunque la intensidad de infección fue alta en Plentzia y moderada en Arriluze. En el tejido conectivo, entre los túbulos digestivos, se observaron esporocistos de *Nematopsis* sp. (Apicomplexa) (Figura II.16 B). En los ejemplares recolectados en Plentzia, la prevalencia fue del 100 % con intensidad de infección alta. En algunos individuos en que la glándula digestiva se encontraba necrosada se observaron los organismos de *Nematopsis* sp. entre el tejido desorganizado (Figura II.16 C). En los ejemplares de Arriluze, la prevalencia de

estos organismos fue del 10 % y su intensidad baja. En ambos sitios se observaron, además, copépodos *Mytilicola* sp. dentro del espacio gastrointestinal (Figura II.16 D) con poca prevalencia ( $P_{\text{Plentzia}} = 10 \%$ ,  $P_{\text{Arriluze}} = 20 \%$ ) e intensidad baja. En Arriluze, además, en un ejemplar se observó, entre los túbulos digestivos y con una infiltración hemocítica focal, la presencia de un organismo sin identificar que fue catalogado como “otros parásitos” (Figura II.16 E). La prevalencia acumulada de parásitos en la glándula digestiva fue del 210% en Plentzia y del 140% en Arriluze.

En el tejido gonadal, solo se observó la presencia de *Nematopsis* sp. en el tejido conectivo rodeando los acinos gonadales en los ejemplares recolectados en Plentzia (Figura II.16 F), con una prevalencia del 70 % e intensidad baja.

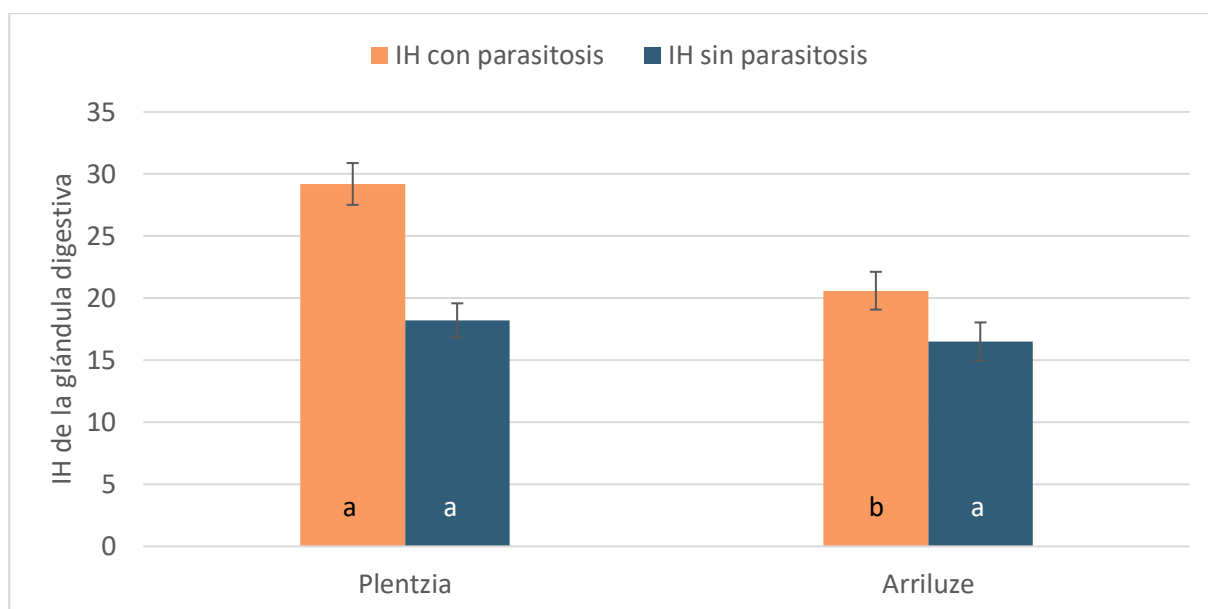


**Figura II.16.** Micrografías de secciones histológicas transversales de la glándula digestiva y tejido gonadal de *Mytilus galloprovincialis* con distintos parásitos. **A.** Vista general de túbulos digestivo con ciliados intracelulares (flecha). **Recuadro:** detalle de dos ciliados con micronúcleos en su interior. **B.** Esporocistos de *Nematopsis* sp. (flecha) en el espacio intertubular. **C.** Detalle de esporocistos de *Nematopsis* sp. en la glándula digestiva necrosada de un ejemplar de Plentzia. **D.** *Mytilicola* sp. dentro del espacio gastrointestinal rodeado de túbulos digestivos con el epitelio desorganizado. **E.** Parásito sin identificar en la glándula digestiva rodeado por infiltración de hemocitos (elipse punteada). Nótese la formación de un granulocitoma (flecha). **F.** Tejido gonadal de un macho de Plentzia con *Nematopsis* sp. (flecha) en el tejido conectivo (tc). Tinción: hematoxilina-eosina. Escalas: A-B, F: 50  $\mu$ m; C: 20  $\mu$ m; D-E: 100  $\mu$ m.

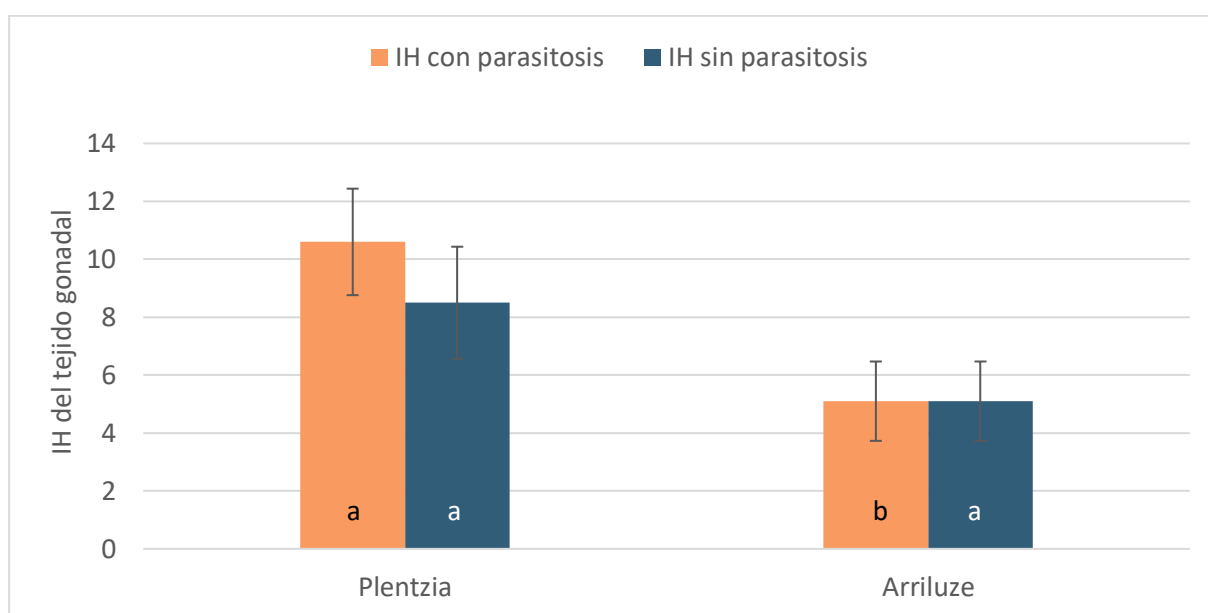
## Índice histopatológico (IH) en glándula digestiva y tejido gonadal

En base a los resultados observados a partir del análisis de parasitosis, a la presencia de *Mytilicola* sp. y la categoría “otros parásitos”, se les asignó un peso de 2 de acuerdo a Cuevas y colaboradores (2015). Asimismo, por considerar que la presencia de organismos ciliados se trataba de una patología de importancia moderada, se le asignó un peso de 2. A la presencia de organismos *Nematopsis* sp. se les asignó un peso de 3 de acuerdo a Cuevas y colaboradores (2015). Luego, se calculó el índice de condición histopatológica (IH) con y sin la parasitosis como se detalló en este capítulo en 2.1.3 Respuestas de biomarcadores celulares y tisulares en la glándula digestiva y tejido gonadal.

En la glándula digestiva, al incluir la parasitosis, se observaron diferencias significativas en el valor de IH de los sitios de estudio (Figura II.17, test de t;  $t = 3,79$ ;  $p < 0,05$ ), siendo el índice en Plentzia mayor ( $29,20 \pm 1,69$ ; media  $\pm$  EE) que en Arriluze ( $20,60 \pm 1,52$ ; media  $\pm$  EE). Al no incluir la parasitosis, el valor de IH en Plentzia fue de  $18,20 \pm 1,38$  y en Arriluze  $16,50 \pm 1,54$  (media  $\pm$  EE), y no se observaron diferencias significativas entre los sitios (Figura II.17, test de t;  $t = 0,82$ ;  $p > 0,05$ ). El mismo patrón se observó al calcular el índice con y sin parasitosis para el tejido gonadal. El valor de IH incluyendo la parasitosis fue casi el doble en Plentzia ( $10,60 \pm 1,84$ ; media  $\pm$  EE) que en Arriluze ( $5,10 \pm 1,37$ ; media  $\pm$  EE) (Figura II.18, test de t;  $t = 2,40$ ;  $p < 0,05$ ). Al no incluir la parasitosis, si bien el valor del IH de Plentzia disminuyó ( $8,50 \pm 1,93$ ; media  $\pm$  EE) y el de Arriluze se mantuvo igual ( $5,10 \pm 1,37$ ; media  $\pm$  EE) ya que no se habían observado parásitos, no se observaron diferencias significativas entre los sitios (Figura II.18, test de t;  $t = 1,43$ ;  $p > 0,05$ ).



**Figura II.17.** Índice de condición histopatológica (IH) con y sin parasitosis para la glándula digestiva de ejemplares de *Mytilus galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze (media  $\pm$  EE). Letras distintas y del mismo color representan diferencias significativas entre los sitios ( $p < 0,05$ ).



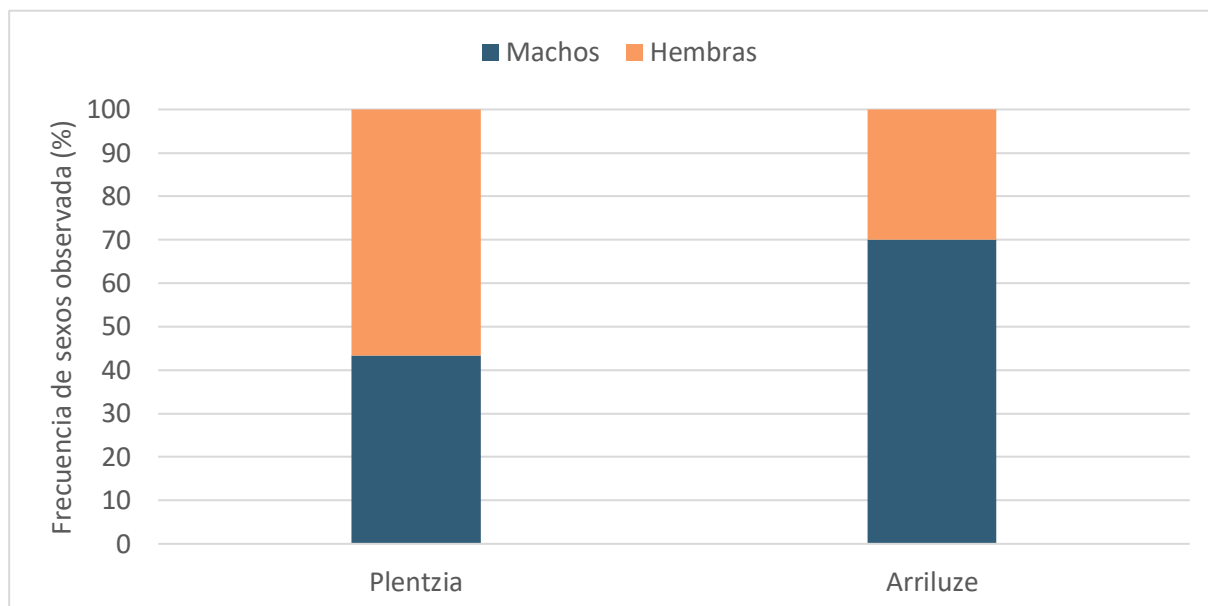
**Figura II.18.** Índice de condición histopatológica (IH) con y sin parasitosis para el tejido gonadal de ejemplares de *Mytilus galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze (media  $\pm$  EE). Letras distintas y del mismo color representan diferencias significativas entre los sitios ( $p < 0,05$ ).

## 2.2.4 Respuestas fisiológicas

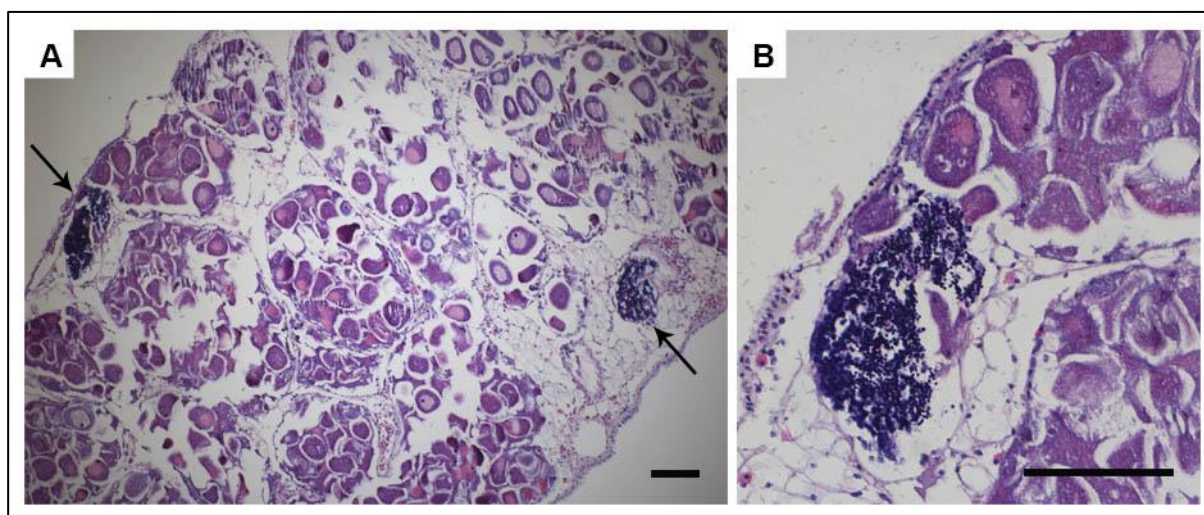
### Desarrollo gametogénico e índice gonadal

Se estudió la proporción de machos y hembras en los ejemplares de los sitios de estudio y se observó que en Plentzia no hubo diferencias significativas con respecto a la

frecuencia esperada 1:1 (Figura 20, Chi-cuadrado = 0,53;  $p > 0,05$ ), mientras que en Arriluze fue de 3M:1H (Figura II.19, Chi-cuadrado = 4,80;  $p < 0,05$ ). Se encontró un único individuo en Plentzia con características de intersexo (Figura II.20).



**Figura II.19.** Frecuencia observada de sexos de ejemplares de *Mytilus galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze.

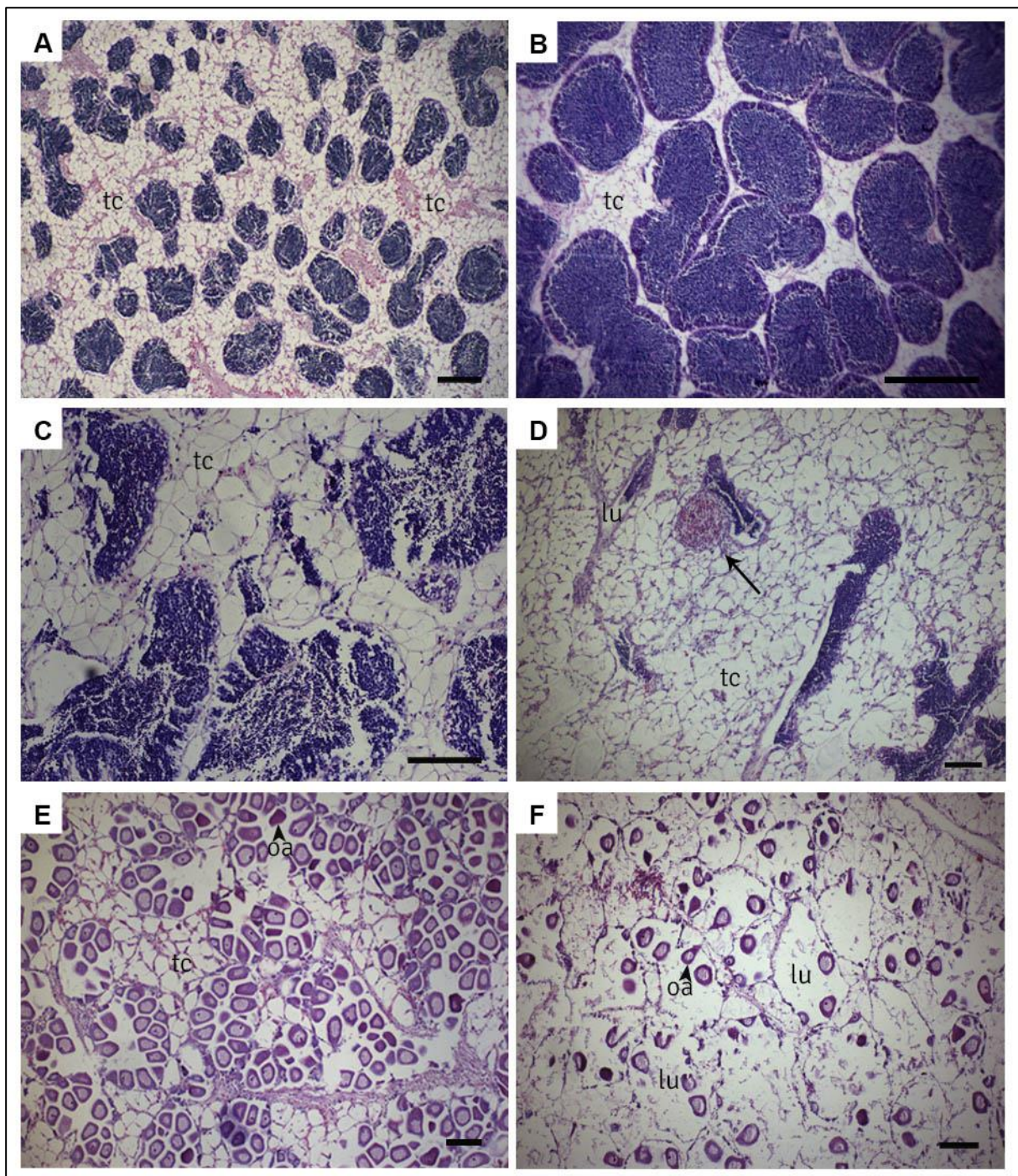


**Figura II.20.** Micrografía del tejido gonadal de un individuo de *Mytilus galloprovincialis* de Plentzia que presenta características de intersexo. **A.** Acinos masculinos inmaduros (flecha) entre acinos atrésicos femeninos. **B.** Detalle del acino masculino. Escala: 100  $\mu$ m.

En la Figura II.21 se observan algunos ejemplos de los diferentes estadios observados, en machos y hembras de *M. galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze. En ninguno de los sitios se observaron ejemplares en el estadio de reposo. En machos, el estadio de desarrollo se

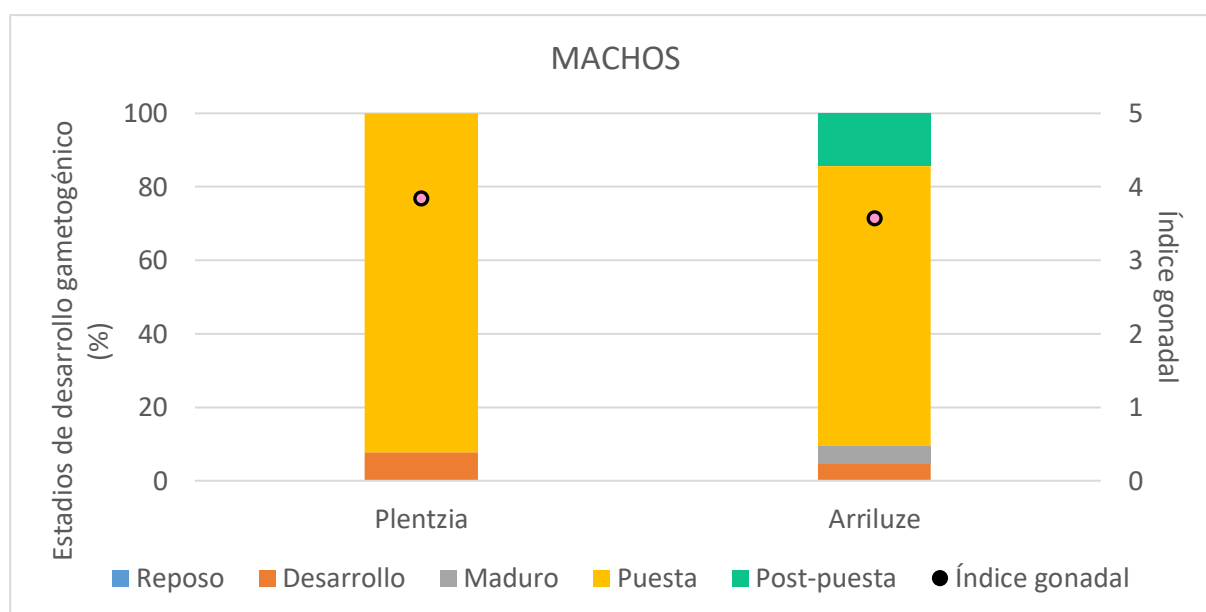
caracterizó por la presencia de acinos pequeños rodeados en mayor parte por tejido conectivo (Figura II.21 A). Dentro de los acinos se observaron células espermatogénicas creciendo hacia el lumen y no se observó la presencia de espermatozoides (Figura II.21 A). En el estadio maduro, los acinos se encontraron repletos de espermatozoides, con un aumento su tamaño y reducción del tejido conectivo circundante (Figura II.21 B). En el estadio de puesta se observó una reducción en la cantidad de espermatozoides presentes en el lumen, indicio de su liberación, y escasas células en espermatogénesis (Figura II.21 C). Finalmente, en el estadio de post-puesta, los acinos presentaron un amplio lumen con escasos espermatozoides y células de la serie espermatogénica comenzando un nuevo ciclo. Además, se observó la presencia de hemocitos —generalmente en forma de granulocitomas— dentro de los acinos como parte de la degradación de las gametas remanentes (Figura II.21 D).

En las hembras solo se observaron los estadios de puesta o desove y post-puesta. En los acinos de las hembras en el estadio de puesta, se observaron espacios vacíos que corresponden a los oocitos que ya fueron liberados, oocitos vitelogénicos desprendidos del epitelio y listos para el desove, unos pocos oocitos vitelogénicos adheridos y, en menor medida, algunos oocitos atrésicos (Figura II.21 E). En las hembras en post-puesta, se observaron los acinos prácticamente vacíos, con oocitos atrésicos (Figura II.21 F). Además, en algunos acinos se observaron algunas oogonias y oocitos previtelogénicos adheridos al epitelio, que indicaban el comienzo de un nuevo ciclo (Figura II.21 F).

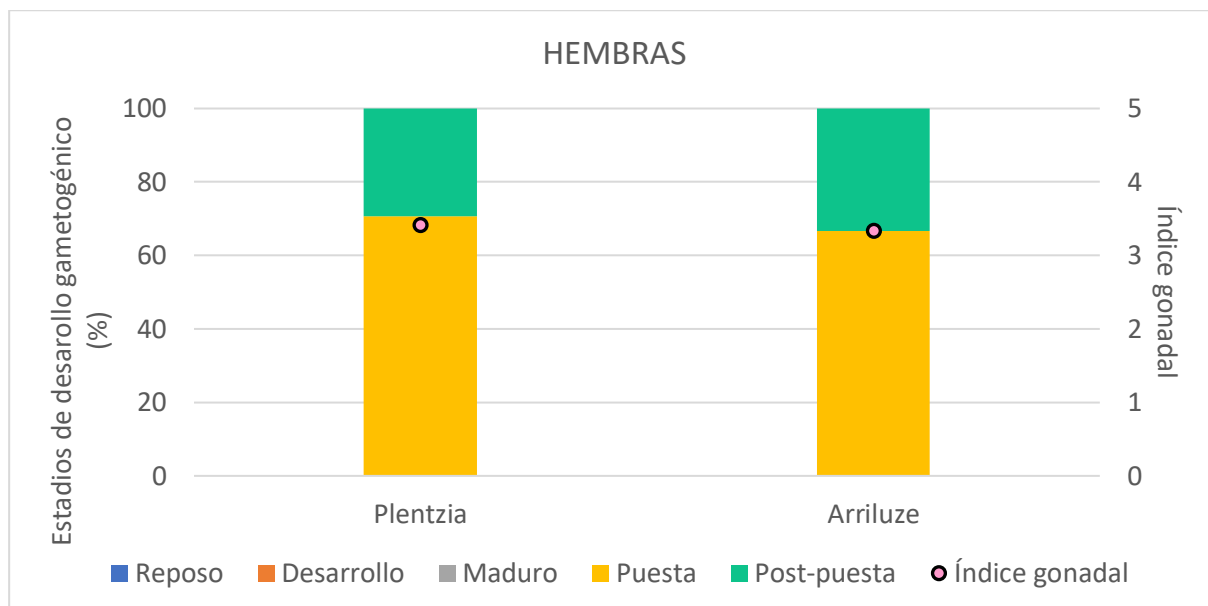


**Figura II.21.** Micrografías del tejido gonadal de machos (A-D) y hembras (E-F) de *Mytilus galloprovincialis* en distintos estadios de desarrollo gametogénico. **A.** Desarrollo: acino con células en gametogénesis rodeado por tejido conectivo (tc). **B.** Maduro: acino repleto de espermatozoides. **C.** Puesta: acinos con escasos espermatozoides. **D.** Post-puesta: acinos donde se distinguen el lumen (lu) y cercano al epitelio células espermatógenicas (punta de flecha). Notése la presencia de un granulocitoma dentro del acino (flecha). **E.** Puesta: acinos con amplio lumen y oocitos vitelogénicos (ov) en el lumen (lu). Nótese la presencia de unos pocos oocitos atrésicos (oa). **F.** Post-puesta: acinos prácticamente vacíos, con oocitos atrésicos (oa). Tinción: hematoxilina-eosina. Escalas: A-B: 200  $\mu$ m; C-F: 100  $\mu$ m.

La proporción de los estadios de desarrollo gametogénico y el índice gonadal calculado para cada sitio se representan en la Figura II.22 para machos y la Figura II.23 para hembras. En los machos de Plentzia se observaron unos pocos ejemplares en el estadio de desarrollo (8 %) y la gran mayoría en el estadio de puesta (92 %). En Arriluze, la mayor proporción de los ejemplares (76 %) se encontró en el estadio de puesta, algunos ejemplares se encontraron en el estadio de post-puesta (14 %) y unos pocos en el estadio de desarrollo (5 %) y maduro (5 %) (Figura II.22). Las hembras de ambos sitios se encontraron principalmente desovando (puesta) y en menor medida en el estadio de post-puesta. En Plentzia, el 71 % de los ejemplares se encontró en el estadio de puesta y el 29 % en post-puesta mientras que en Arriluze estas proporciones fueron del 67 % y 33 %, respectivamente (Figura 24). El IG en machos y hembras de ambos sitios fue similar (Figuras II.22 y II.23).



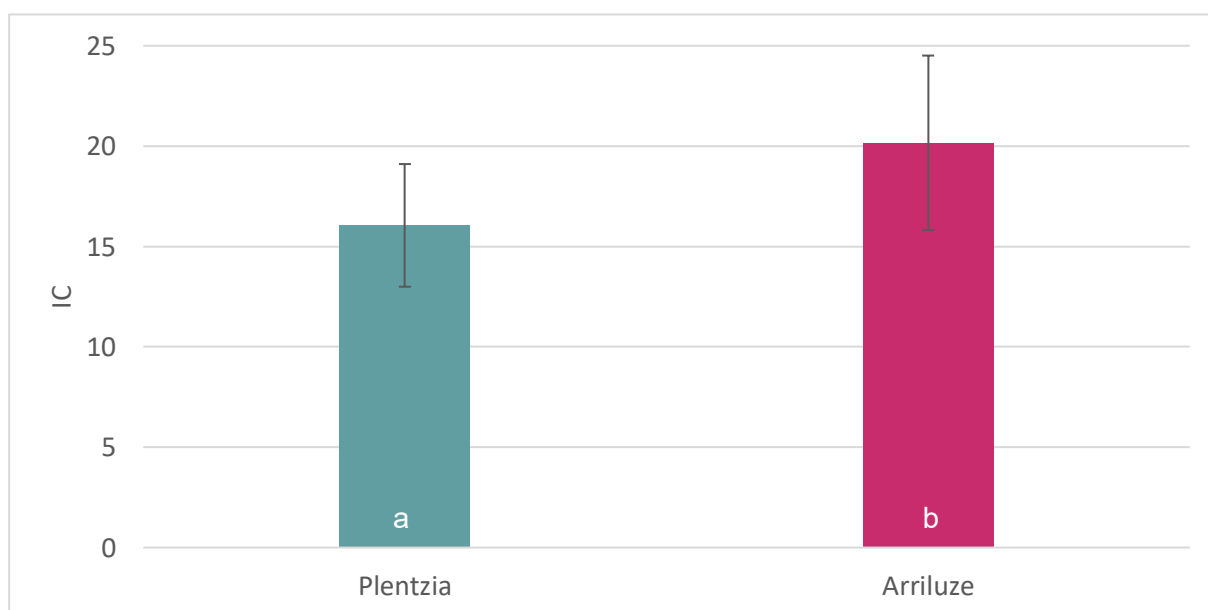
**Figura II.22.** Porcentaje del desarrollo gametogénico (representado por barras) e índice gonadal (representado por puntos) de los ejemplares macho de *Mytilus galloprovincialis* en Plentzia y Arriluze.



**Figura II.23.** Porcentaje del desarrollo gametogénico (representado por barras) e índice gonadal (representado por puntos) de los ejemplares macho de *Mytilus galloprovincialis* en Plentzia y Arriluze.

### Índice de condición del estado de salud general (IC)

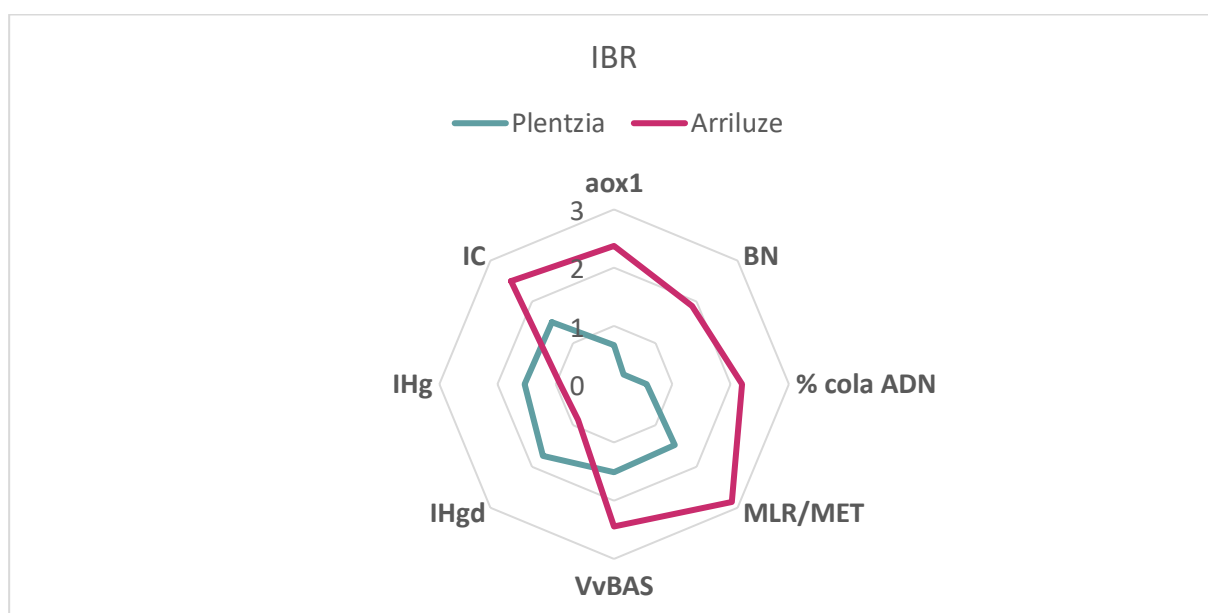
Se observaron diferencias significativas en el IC entre los sitios de estudio, con un IC en los ejemplares recolectados en Plentzia ( $16,05 \pm 3,06$ ) menor que en Arriluze ( $20,16 \pm 4,35$ ) (media  $\pm$  DE) (Figura II.24, test de t;  $t = 3,46$ ;  $p < 0,05$ ).



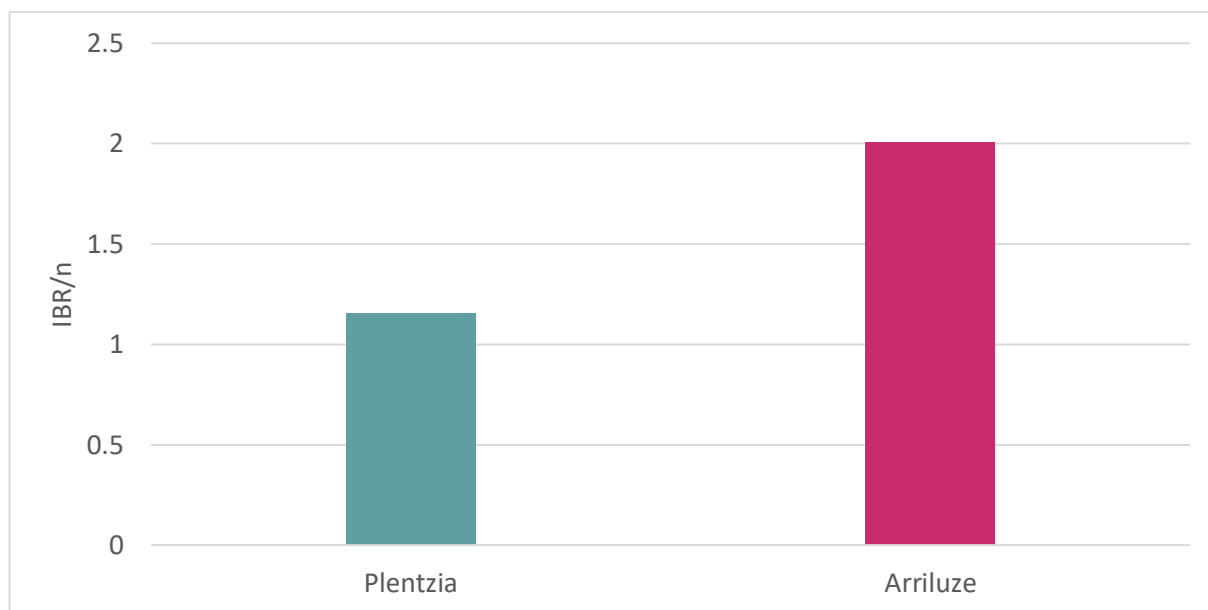
**Figura II.24.** Índice de condición (IC) de los individuos de *Mytilus galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze (media  $\pm$  DE). Letras distintas representan diferencias significativas entre los sitios ( $p < 0,05$ ).

## 2.2.5 Integración de las distintas respuestas biológicas

Los parámetros utilizados para el cálculo del IBR fueron los siguientes: *aox1*, frecuencia de brotes nucleares y % cola de ADN (nivel bioquímico y daño genético); MLR/MET, VvBAS, IHgd e IHg (ambos sin parásitos) (nivel tejido); IC (nivel fisiológico). Estos fueron seleccionados con el fin de representar diferentes niveles de organización biológica y funciones. En la Figura II.25 se representa el grado de contribución de cada respuesta biológica en cada sitio de estudio. En Plentzia, las respuestas que mayor aporte hicieron al IBR/n fueron los índices histopatológicos IHgd e IHg, mientras que en Arriluze fueron el MLR/MET y el IC (Figura II.25). El valor del IBR/n fue mayor en Arriluze que en Plentzia (Figura II.26).



**Figura II.25.** Gráficos radiales de las respuestas biológicas estudiada en *Mytilus galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze. Cada vértice radial representa el grado relativo de cada respuesta. *aox1*: gen *aox1*; BN: brotes nucleares; % cola ADN: porcentaje de la cola de ADN; MLR/MET: radio medio del lumen/altura media del epitelio; VvBAS: densidad en volumen de las células basófilas; IHgd: índice histopatológico de la glándula digestiva; IHg: índice histopatológico del tejido gonadal; IC: índice de condición.



**Figura II.26.** Índice de respuestas biológicas (IBR/n) en *Mytilus galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze.

## 2.3 DISCUSIÓN

En el presente estudio, se propuso determinar los potenciales efectos biológicos en ejemplares de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 recolectados en dos ambientes costeros del Golfo de Vizcaya (España) con distintos tipos de impacto antrópico. Para ello, se evaluaron dos sitios ubicados en la bahía de Vizcaya: Plentzia, un sitio relativamente limpio con un puerto pesquero ubicado en el estuario de Butroe, y Arriluze un puerto deportivo ubicado en el estuario de Bilbao. Históricamente, Plentzia ha sido considerado un sitio de referencia en estudios de monitoreo ambiental de la contaminación (Orbea et al., 2002; de los Ríos et al., 2013, 2016a; Briaudeau et al., 2020), principalmente al compararlo con Arriluze (Soto et al., 1995; Saiz-Salinas, 1997; Orbea et al., 1999; Lekube et al., 2014; Blanco-Rayón et al., 2020).

En el presente trabajo la temperatura superficial del agua y el pH fueron similares en ambos sitios de estudio, en cambio la salinidad de Arriluze fue un poco menor. Si bien el estuario de Bilbao es principalmente eurihalino, en ciertos periodos se ha observado una disminución en la salinidad debido a las descargas de los ríos (Iriarte et al., 2010, 2016).

En base a lo discutido en el Capítulo 1 de esta Sección, los sedimentos de Plentzia y Arriluze no se encuentran contaminados por  $\Sigma$ HAPs, aunque el nivel de ciertos HAPs individuales indican contaminación moderada. Por otro lado, las concentraciones de  $\Sigma$ PCBs y Cd, Cr, Ni y Pb en los sedimentos de Arriluze también indican que es un sitio de contaminación moderada, y los valores de Cu y Zn superaron el ERM por lo que el riesgo toxicológico de estos contaminantes es alto. Los ejemplares de *M. galloprovincialis* no se encuentran contaminados por HAPs, PCBs, ni metales en ninguno de los sitios, excepto por el Cd encontrado en Arriluze.

Los mejillones de ambos sitios se encontraron en sincronía reproductiva, principalmente en el estadio de puesta y con un alto índice gonadal (IG). Esto coincide con lo observado en *M. galloprovincialis* en trabajos previos, también durante la primavera, en los mismos sitios de estudio (Blanco-Rayón et al., 2020). Al analizar la frecuencia de sexos, en Plentzia se observó que esta fue igual a la esperada para la especie (1:1) (Seed, 1969) y

similar a estudios previos en el área (Blanco-Rayón et al., 2020). Además, si bien en Plentzia se encontró un individuo que presentó características de intersexo, esta baja proporción corresponde a la variabilidad natural de los mitílidos. Contrariamente a lo observado en estudios previos (Blanco-Rayón et al., 2020), en los ejemplares de Arriluze, la proporción de machos fue significativamente mayor que la de las hembras (3M:1H). Cabe mencionar que, en un estudio realizado en Plentzia y Arriluze en distintas temporadas, durante la temporada de otoño en Plentzia se observó el patrón de sexos 3M:1H, pero los autores tomaron este resultado como “cercano a la proporción 1:1” sin analizarlo en mayor detalle (Blanco-Rayón et al., 2020). Sin embargo, una relación del triple del valor esperado merece especial atención, ya que podría deberse a la presencia de algún xenobiótico con efectos androgénicos en el ambiente. En el estuario de Bilbao, en Getxo (sitio cercano a Arriluze), ha habido reportes de la presencia de TBT en los años 2007 y 2008 (Rodríguez et al., 2010), compuesto ampliamente conocido por producir masculinización en moluscos. A pesar de que el TBT fue prohibido mundialmente en 2008, su persistencia en sedimentos y efectos a largo plazo en la biota han sido reportados (Collins et al., 2011). Por otro lado, diversos estudios indican que ciertos compuestos químicos de preocupación emergente como los surfactantes de detergentes, productos farmacéuticos y hormonales pueden ejercer efectos de desorganización endocrina en bivalvos alterando el desarrollo de las gametas, la determinación sexual y la frecuencia de sexos (Nice et al., 2003; Nice, 2005; Smolarz et al., 2017). Hallmann y colaboradores observaron que los mejillones que habitaban cerca de una planta de tratamiento de aguas, presentaban un aumento de xenoestrógenos como el 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2, componente principal de las píldoras anticonceptivas) pero una disminución de otros estrógenos, lo que podía provocar cambios en la determinación sexual (Hallmann et al., 2016). En estudios de laboratorio también se ha observado que la incorporación de esteroides puede producir masculinización en bivalvos (Wang y Croll, 2004). Estos compuestos, aquí no medidos, podrían ser responsables de la diferencia en la proporción de sexos observada en Arriluze.

La exposición a contaminantes en moluscos puede provocar proliferación en los peroxisomas, las organelas involucradas en el metabolismo de los lípidos (Guerlet et al.,

2006). Esta proliferación puede medirse mediante la inducción en la actividad de la enzima palmitoil-CoA oxidasa (AOX1), que es la enzima involucrada en el primer paso de la  $\beta$ -oxidación peroxisomal de ácidos grasos. En bivalvos, dicha inducción ha sido estudiada principalmente en relación con la presencia de compuestos orgánicos persistentes como HAPs y PCBs (Cancio et al., 1999; Cajaraville et al., 2003; Orbea y Cajaraville, 2006). Los valores de la actividad de AOX1 de los mejillones de Plentzia y Arriluze, aunque no presentaron diferencias significativas, fueron mayores que reportes previos en la misma especie en Plentzia (Cancio et al., 1999; de los Ríos et al., 2013). La falta de diferencias entre los sitios es consistente con la falta de diferencias observadas en las concentraciones de  $\Sigma$ HAPs y  $\Sigma$ PCBs en los mejillones, aunque la actividad de esta enzima podría ser inducida por los metales (Guerlet et al., 2006). Sin embargo, a nivel transcriptómico el gen *aox1* presentó mayores niveles de transcripción en los ejemplares de Arriluze que los de Plentzia. La diferencia observada a nivel de la actividad de la enzima y de los transcritos podría deberse a mecanismos celulares compensatorios que, ante un gran aumento de transcritos, terminarían degradándolos y no observándose así, diferencias en la cantidad de las proteínas. Por otro lado, dicha diferencia podría deberse a regulaciones postraduccionales que reducirían la actividad de la enzima sintetizada. La transcripción de ARNm reflejaría los primeros pasos de una secuencia de eventos y por tal motivo deberían ir siempre acompañados por mediciones de otros biomarcadores en distintos niveles de organización (Navarro et al., 2011). Además del gen *aox1*, también se analizó la transcripción de otros genes en la glándula digestiva relacionados con distintas respuestas frente a contaminantes: *cat* (catalasa, respuesta antioxidante), *gstpi* (glutación-S-transferasa pi 1, metabolismo de biotransformación), y *mt20* (respuesta de exposición a metales). Ninguno de los genes mencionados presentó diferencias significativas en su transcripción en los mejillones de Plentzia y Arriluze. En adultos de *Mytilus* spp. se observó una inducción del gen *cat* en la glándula digestiva luego de la exposición por 15 días a fluoranteno (HAP) y microplásticos (Paul-Pont et al., 2016), mientras que en estadios larvales de *M. galloprovincialis* la exposición a bisfenol A (otro HAP) produjo una inducción de los genes *cat*, *sod*, *gst* y *hsp* (Balbi et al., 2016). Por otro lado, en el mejillón zebra, *Dreissena polymorpha*, se observó una inhibición

de *cat* luego de la exposición durante 7 días al Cu, aunque no se observaron diferencias en la expresión del gen *gst* en los mejillones expuestos a otros metales (Navarro et al., 2011). Sin embargo, ciertos metales como Cd y Hg produjeron una inducción del gen *mt* (Navarro et al., 2011). La inducción de la transcripción de *mt20* luego de la exposición a Cd también fue observada en *M. galloprovincialis* en distintos estudios (Dondero et al., 2005; Zorita et al., 2007b). Si bien la concentración de Cd fue significativamente mayor en los mejillones de Arriluze en comparación con los de Plentzia, dicha concentración pareciera no haber sido suficiente para generar diferencias significativas en la transcripción de *mt20* en el presente estudio. Además, los resultados previamente mencionados son producto de ensayos de laboratorio donde las concentraciones de exposición pueden no ser ambientalmente realistas. En trabajos de campo, suele observarse una mayor variabilidad en los niveles de transcripción de ciertos genes. Por ejemplo, en un monitoreo activo en la Bahía de Vizcaya, al evaluar los niveles de transcripción de *mt20*, no se observaron diferencias significativas entre los sitios contaminados y el sitio de referencia (Plentzia) (de los Ríos et al., 2013). La falta de diferencias en la transcripción de *cat*, *gstpi* y *mt20*, podría deberse a la falta de diferencias en las concentraciones de  $\Sigma$ HAPs,  $\Sigma$ PCBs y de la mayoría de los metales analizados en los mejillones. Sin embargo, es necesario ampliar los estudios transcriptómicos en ambientes naturales con distintos tipos de impacto antrópico. En este sentido, se planea ampliar la selección de genes en la glándula digestiva, incluyendo genes como *sod* (superóxido dismutasa) y *hsp90* (proteína de choque térmico) relacionados con respuestas antioxidantes y de estrés general, respectivamente. Además, con el fin de evaluar si la diferencia en la proporción de sexos observada en Arriluze podría deberse a la presencia de contaminantes de desorganización endocrina, se planea extender el análisis transcriptómico al tejido gonadal. Para ello, se estudiará la hipótesis de la presencia de compuestos estrogénicos analizando los niveles de transcripción del gen *vtg* (vitelogenina), como así también la hipótesis de compuestos androgénicos analizando los niveles de transcripción de *vcl* (lisina de la cubierta vitelina) y *verl* (receptor de la cubierta vitelina para la lisina) como marcadores de respuesta de desorganización endocrina.

Los efectos genotóxicos de los contaminantes también pueden evaluarse a partir de alteraciones o daño en el ADN (Claxton et al., 1998). Los contaminantes pueden producir ruptura de los cromosomas o fallas en la segregación cromosómica durante la mitosis produciendo alteraciones como micronúcleos (MN) o brotes nucleares en distintas células, particularmente en los hemocitos de los bivalvos (Baršienė et al., 2010, 2012; Bolognesi y Fenech, 2012). La frecuencia de MN en los hemocitos de los mejillones de Plentzia y Arriluze no presentó diferencias significativas. Los valores observados en ambos sitios fueron menores que los previamente reportados en *M. galloprovincialis* de la costa del Mediterráneo (Baršienė et al., 2012), y menores que los valores basales reportados para la especie en sitios no contaminados (Davies et al., 2012); con lo cual, con este biomarcador no se evidenciaron daños genotóxicos. Sin embargo, al analizar la frecuencia de brotes nucleares, esta fue significativamente mayor en los hialinocitos de los ejemplares de Arriluze. Además, en ambos sitios la frecuencia fue mayor que los valores observados en mejillones de sitios contaminados y no contaminados (Bolognesi y Fenech, 2012). A pesar de que los valores observados en Plentzia fueron menores a los de Arriluze, también evidenciarían un daño cromosómico —irreversible— en el ADN de los mejillones. Por otro lado, se evaluó la ruptura de las hebras del ADN —daño reversible— a partir del ensayo cometa, otro de los biomarcadores recomendados para evaluar el daño a nivel genético (Lyons et al., 2012). Los valores en el porcentaje de la cola de ADN de Plentzia fueron similares a los valores basales reportados para *M. edulis* (Davies et al., 2012) mientras que los de Arriluze fueron superiores, lo que supone que existe un riesgo ambiental. Diversos contaminantes, como el tributilestaño (TBT), han demostrado causar genotoxicidad en los bivalvos (Hagger et al., 2005; Lyons et al., 2012). Recientemente, se ha reportado que la exposición a microplásticos (MP) puede generar daños en el ADN de los hemocitos de *M. galloprovincialis* (González-Soto et al., 2022). El daño genético observado en los mejillones de Plentzia y Arriluze podría estar causado por alguno de los contaminantes mencionados. Si bien a la fecha no hay estudios sobre la acumulación de MP en *M. galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze, en la Bahía de Vizcaya son varios los estudios que han registrado su presencia en agua, sedimento y biota, convirtiéndolo en un sitio de contaminación moderada por MP (Reguera et al., 2019; Mendoza et al., 2020).

Además, la ingestión de MP puede facilitar el transporte de otros contaminantes a los organismos, fenómeno conocido como “efecto troyano o de caballo de Troya” (Browne et al., 2013; Cole y Galloway, 2015; Lusher, 2015; Guo y Wang, 2019; Vivekanand et al., 2021).

Si bien las concentraciones de los metales encontradas en los sedimentos de ambos sitios fueron altas en comparación con las observadas en los mejillones, es sabido que las concentraciones de metales en masa visceral de moluscos pueden ser alteradas por diversas variables naturales (Soto y Marigómez, 1997). A nivel celular, se evaluó la respuesta a la presencia de metales a través un *kit* de autometalografía. Las técnicas autometalográficas permiten revelar histoquímicamente la presencia de iones metálicos en la glándula digestiva que se pueden observar y cuantificar mediante la acumulación de depósitos negros de plata (BSD, por sus siglas en inglés) (Danscher, 1984; Soto y Marigómez, 1997a 1997b; Raftopoulou et al., 2003). Esta técnica ha sido aplicada previamente en *M. galloprovincialis* para cuantificar la presencia de depósitos metálicos intralisosomales en las células digestivas tanto en estudios de laboratorio (Jimeno-Romero et al., 2017; Duroudier et al., 2019a, 2021) como en trabajos de campo (de los Ríos et al., 2013, 2016b, 2018). En el presente trabajo, se utilizaron como controles positivos cortes de mejillones *M. galloprovincialis* expuestos a 750 µg/L de Ag, y sus respectivos controles no expuestos. El *kit* autometalográfico demostró ser eficaz y sensible en estos cortes, pero no así en los cortes de los ejemplares de *M. galloprovincialis* de Plentzia y Arriluze; por lo tanto, la cuantificación de los BSD no pudo realizarse. Es posible que esto se deba a que las concentraciones de metales en *M. galloprovincialis* fueron mucho menores que las analizadas en estudios previos que utilizaron técnicas autometalográficas con muestras ambientales (de los Ríos et al., 2013, 2016b, 2018). Si bien la técnica ha demostrado ser de gran utilidad, no sería lo suficientemente sensible para evaluar muestras ambientales de sitios donde los metales detectados no se encuentran en elevadas concentraciones en los mejillones.

La exposición a la contaminación crónica puede generar efectos biológicos a largo plazo a nivel tisular en los organismos acuáticos (Orbea et al., 2006; Garmendia et al., 2011a). La evaluación de distintas histopatologías ha probado ser una herramienta sencilla y sensible para la determinación de alteraciones relacionadas a distintos contaminantes en los bivalvos

(Bignell et al., 2012). La glándula digestiva de los bivalvos es un órgano de gran plasticidad y los túbulos digestivos presentan distintas modificaciones morfológicas de acuerdo a los procesos y etapas digestivas que atraviesa (Langton, 1975). Estas modificaciones pueden incluir un engrosamiento o adelgazamiento del epitelio. Sin embargo, dicho adelgazamiento, conocido como atrofia de los túbulos digestivos, también puede producirse por la exposición a diversos contaminantes (Lowe et al., 1981; Cajaraville et al., 1992, 1993; Garmendia et al., 2011). La atrofia de los túbulos digestivos, puede evaluarse cualitativamente pero también cuantitativamente, a través de parámetros como la relación MLR/MET y MET/MDR: valores altos de la relación MLR/MET y valores bajos de MET/MDR indican la presencia de atrofia de los túbulos digestivos (Garmendia et al., 2010; Brooks et al., 2011; Bignell et al., 2012). Además, frente a distintos xenobióticos, puede producirse una alteración en la composición celular del epitelio digestivo. Este generalmente está compuesto por dos tipos celulares: células digestivas y células basófilas. En condiciones fisiológicas normales, las células digestivas son el tipo celular más abundante; sin embargo, en situaciones de estrés, puede ocurrir una disminución de las células digestivas y un aumento neto en el número de células basófilas, fenómeno conocido como hiperplasia de células basófilas (Marigómez et al., 1998; Zaldibar et al., 2007a; Brooks et al., 2012; Blanco-Rayón et al., 2019). Esta hiperplasia es reversible y puede cuantificarse mediante la densidad en volumen de las células basófilas (VvBAS). Complementariamente, la pérdida de tejido digestivo puede evaluarse midiendo la proporción entre el tejido conectivo y digestivo (CTD, por sus siglas en inglés) (Brooks et al., 2011; Marigómez et al., 2017). La glándula digestiva de los mejillones de Arriluze presentó valores significativamente más bajos de MLR/MET y más altos de MET/MDR que Plentzia, indicando que la atrofia de los túbulos fue mayor en los mejillones de Plentzia. Blanco-Rayón y colaboradores, al analizar las variaciones de MLR/MET en Plentzia y Arriluze, también observaron mayor atrofia en Plentzia durante el invierno, pero no así en primavera (Blanco-Rayón et al., 2020). Los valores de MLR/MET, si bien estuvieron dentro del intervalo de valores observados por estos autores a lo largo de distintas temporadas en estos sitios de estudio, fueron superiores a los valores basales y a los criterios de evaluación ambiental (análogos de ERM) establecidos por ICES para la especie (Davies et al., 2012). Esto fue

consistente con la alta prevalencia de atrofia de los túbulos digestivos observada en los mejillones de ambos sitios. La hiperplasia de células basófilas en Arriluze fue mayor que en Plentzia, coincidiendo con el mayor valor de VvBAS observado en Arriluze. Sin embargo, el valor de este parámetro, fue superior al intervalo de valores observados por Blanco-Rayón y colaboradores (2020) en *M. galloprovincialis* e incluso fue mayor a los valores críticos de riesgo toxicológico establecidos por ICES para *Mytilus* spp. (Bignell et al., 2012; Davies et al., 2012). La relación entre el tejido conectivo y el tejido digestivo medida con el parámetro CTD no presentó diferencias significativas entre ambos sitios de estudio, lo cual fue consistente con la prevalencia observada para el aumento del espacio intertubular. El hecho de que los biomarcadores analizados a nivel tisular (al igual que en el nivel genético) sean, en ambos sitios, mayores que los valores basales estipulados por ICES, podría indicar que Plentzia también está sufriendo algún tipo de presión ambiental. Por otro lado, la metodología aquí empleada podría ser otra de las causas de las diferencias en el intervalo de valores de los biomarcadores tisulares de la glándula digestiva. En el presente estudio, se utilizó el programa AxioVision para evaluar los parámetros MLR/MET y MET/MDR y el programa STEPanizer1 para el VvBAS y CTD, mientras que los trabajos previos de *Mytilus* spp. se han realizado utilizando una cámara clara y sistemas reticulares de Weibel (Weibel, 1979). Si bien las guías de ICES sugirieron estas metodologías hace años, también indicaron que el análisis podía hacerse con la ayuda de cualquier programa analizador de imágenes (Bignell et al., 2012). El programa AxioVision es de libre acceso y permite el análisis de imágenes de manera rápida y sencilla y el programa STEPanizer1 ha sido diseñado por el propio Weibel con el fin de brindar una herramienta accesible y de fácil uso (Tschanz et al., 2011). Sería entonces necesaria una revisión y actualización de los valores base de los parámetros MLR/MET, VvBAS, CTD (y similares) para *Mytilus* spp aplicando nuevas tecnologías con el fin de poder realizar comparaciones más actuales. En este sentido, el presente trabajo brindaría el primer aporte a esta tarea. Además, se incluye en el Anexo de esta tesis la metodología detallada paso a paso para realizar los análisis utilizando los programas mencionados.

En la glándula digestiva de ambos sitios se observaron, además, distintas histopatologías que incluyeron infiltración hemocítica, células pigmentadas en el tejido

conectivo, agregados simil-lipofuscinas, hipervacuolización de células digestivas, granulocitomas, fibrosis y necrosis. Todas estas alteraciones, indicadoras de estrés general, presentaron elevadas prevalencias en ambos sitios, pero la prevalencia acumulada fue mayor en los mejillones de Plentzia que en los de Arriluze. En el análisis histológico del tejido gonadal, las alteraciones más abundantes en ambos sitios fueron la infiltración hemocítica, la presencia de granulocitomas, la atresia oocitaria en hembras, y la necrosis. Además, en algunos ejemplares recolectados en Arriluze, se observó la presencia de células pigmentadas en los acinos y agregados simil-lipofuscinas. Dentro de las alteraciones observadas, la atresia oocitaria fue llamativamente severa. La atresia oocitaria es un fenómeno natural en el ciclo reproductivo de los bivalvos, aunque puede ser inducida en condiciones desfavorables para el desove, y producir una sobre maduración de las gametas que genera la degeneración y reabsorción del tejido gonadal (Smolarz et al., 2017). Dentro de las condiciones desfavorables se encuentran factores ambientales o la baja disponibilidad de alimento (por esto motivo suele aumentar en invierno y disminuir en primavera) pero también la presencia de contaminantes, como ya ha sido observado en la Bahía de Vizcaya (Ortiz-zarragoitia y Cajaraville, 2010). Beninger (2017), realizó una exhaustiva revisión del fenómeno de atresia en distintas familias de bivalvos, y señaló que lo que a veces es catalogado como “atresia severa” se trata en realidad de un fenómeno denominado “atresia pre-desove”. La atresia observada entonces no sería una degradación y reabsorción luego del desove, sino más bien una falla precipitada, generada por condiciones desfavorables, que ha impedido el correcto desove, con grandes consecuencias poblacionales (Beninger, 2017). Las imágenes de la atresia pre-desove presentadas en el trabajo previamente mencionado son muy similares a la atresia aquí observada. Así, el fenómeno de atresia pre-desove podría estar estrechamente relacionado con la alta prevalencia de otras alteraciones observadas en el tejido gonadal como la infiltración hemocítica, los granulocitomas y la necrosis. Al igual que en la glándula digestiva, en el tejido gonadal, la prevalencia acumulada de las distintas alteraciones histopatológicas fue mucho mayor en Plentzia, lo que sugiere que esta población se encuentra bajo cierto grado de estrés.

Por otro lado, la presencia de patógenos también puede producir patologías que afectan las condiciones histológicas de los organismos acuáticos y estas podrían confundirse con los efectos generados por la contaminación (Bignell et al., 2012). En la glándula digestiva de los mejillones de Plentzia y Arriluze se detectó la presencia de cuatro tipos distintos de parásitos: ciliados, *Nematopsis* sp., *Mytilicola* sp. y un parásito sin identificar. En el tejido gonadal en cambio, solo se observó la presencia de *Nematopsis* sp. en los ejemplares recolectados en Plentzia. *Mytilicola* sp. es un copépodo comensal que habita los conductos gastrointestinales de los moluscos y no suele ser considerado nocivo. Los ciliados y *Nematopsis* sp. son considerados simbioses que tampoco suelen provocar daños en los mejillones. Sin embargo, la elevada infección de estos parásitos puede ser patogénica (Garmendia et al., 2010). Además, otros estudios han catalogado la presencia de ciliados y *Mytilicola* sp. como patologías de importancia moderada, mientras que la presencia de *Nematopsis* sp. ha sido considerada como una patología más severa (Cuevas et al., 2015). Si bien, en los ejemplares de ambos sitios, la prevalencia de los ciliados y *Mytilicola* sp. fueron similares, la prevalencia de *Nematopsis* sp. fue muy superior a la observada en los ejemplares de Arriluze, tanto en glándula digestiva como en tejido gonadal. Así, la prevalencia acumulada de parásitos observada en la glándula digestiva y tejido gonadal de los mejillones de Plentzia fue muy superior a la de los mejillones de Arriluze. La prevalencia de la infiltración hemocítica fue similar, aunque la presencia de células pigmentadas fue del doble en la glándula digestiva de los mejillones de Plentzia. Dichas patologías están asociadas a respuestas inflamatorias generales en los moluscos (Bignell et al., 2012). Por otro lado, en el tejido gonadal de los mejillones de Plentzia, la prevalencia de parásitos y la infiltración hemocítica fueron muy superiores a las observadas en Arriluze. Por todo esto, la infección de parásitos podría ser la responsable de una elevada respuesta inflamatoria en los mejillones de Plentzia.

La incorporación de un índice histopatológico (IH), permite evaluar e integrar las alteraciones en un único valor en el análisis de los distintos tejidos afectados con el fin de facilitar la interpretación de los resultados (Costa et al., 2013; Cuevas et al., 2015). El IH fue calculado con y sin parasitosis para evaluar el efecto que los patógenos podrían tener sobre el índice. Tanto en la glándula digestiva como en el tejido gonadal, al no incluir la parasitosis,

el valor del IH fue similar en los ejemplares de *M. galloprovincialis* de ambos sitios y no se observaron diferencias significativas. Al incluir la parasitosis en ambos tejidos ocurrió lo contrario, siendo los valores del IH mayores en los mejillones de Plentzia. Esto se debe a que la prevalencia de parásitos en Plentzia fue mayor que la de Arriluze por lo que la presencia de los parásitos estaría sobreestimando el daño histológico debido a la contaminación. Esto indicaría que el índice incluyendo la parasitosis sería menos sensible al comparar entre sitios, enmascarando el estado de salud real de la especie (Costa et al., 2013; Cuevas et al., 2015). Sin embargo, ambos índices deben ser calculados para poder entender la importancia de la parasitosis.

De manera complementaria, se evaluó el estado de salud de *M. galloprovincialis* en los sitios de estudio a partir del índice de condición (IC). Se observó que los ejemplares de Arriluze presentaron una mejor condición fisiológica que los de Plentzia, al igual que en trabajos previos (Blanco-Rayón et al., 2020). Históricamente, Arriluze ha sido un sitio que ha recibido grandes cantidades de desechos industriales y aguas residuales, lo que ha producido un enriquecimiento en el contenido de materia orgánica (de los Ríos et al., 2016b). Un mayor contenido de materia orgánica generaría una mayor disponibilidad de alimento en Arriluze y por este motivo los mejillones presentarían un mayor IC (Ortiz-zarragoitia y Cajaraville, 2010; Cajaraville et al., 2016; Blanco-Rayón et al., 2020). Además, estos resultados son consistentes con lo observado en el análisis histopatológico y el IH.

Por último, los biomarcadores y respuestas fisiológicas fueron integrados utilizando el índice integral de respuesta biológica (IBR/n), que permite combinar las distintas respuestas biológicas en un único valor y facilitar la interpretación de los resultados (Broeg y Lehtonen, 2006). En Plentzia, la respuesta que mayor aportó al IBR fue el IH (de glándula digestiva y tejido gonadal), mientras que en Arriluze fueron el MLR/MET y el IC. El IBR/n calculado fue mayor en Arriluze, indicando que los mejillones están sometidos a un mayor estrés en este sitio.

El presente trabajo contribuye a la evidencia sobre la disminución observada en los últimos años de ciertos contaminantes heredados en Arriluze. Además, se aportan nuevas evidencias sobre el estado ambiental de Plentzia, que pareciera estar levemente impactado

por algún estresor por lo que no debería ser considerado un sitio de referencia. Los efectos observados en los biomarcadores analizados en *M. galloprovincialis* indicarían que es necesario realizar estudios futuros que incluyan mediciones de otros contaminantes de preocupación emergente como los microplásticos y esteroides o incluso contaminantes heredados como el TBT. Además, se brindó por primera vez información sobre los niveles de transcripción de ciertos genes de respuesta asociada a la contaminación en los sitios de estudio.

## CONCLUSIONES

El objetivo general de la presente tesis fue analizar la salud ambiental de dos áreas marino-costeras en Argentina y el País Vasco a través de un enfoque integral utilizando dos especies de mitílidos, *Brachidontes rodriguezii* en Argentina y *Mytilus galloprovincialis* en el País Vaso. Para ello se evaluaron en las dos especies las respuestas y efectos, en diferentes niveles de organización biológica, causados por la posible contaminación generada por las diferentes actividades de origen antrópico. El objetivo general se desarrolló en dos Secciones con su propia metodología, resultados y una discusión acorde a lo observado y antecedentes previos.

### **Enfoque ambiental integrado para evaluar los efectos biológicos de contaminación del mitílido *Brachidontes rodriguezii***

En la Sección I se estudiaron tres sitios con distintos tipos de impacto de origen antrópico: PB: sitio de referencia; PC: sitio con una planta de tratamiento de aguas residuales y PMdP: sitio en una zona portuaria. El primer objetivo de la Sección I fue determinar la disponibilidad de diferentes contaminantes a lo largo del año en el sedimento y su relación con la bioacumulación en el mitílido *B. rodriguezii*. Los sedimentos de las tres zonas estudiadas no se encuentran contaminados por hidrocarburos (alifáticos y aromáticos policíclicos) ni metales. Sin embargo, los mejillines evidenciaron bioacumulación de estos contaminantes. En la población de *B. rodriguezii* de PB y PC, los niveles de acumulación indican baja contaminación de hidrocarburos alifáticos y moderada de aromáticos policíclicos que provienen principalmente de la combustión. En ambos sitios, las concentraciones de metales fueron bajas, excepto en PB donde las concentraciones de Cd durante las temporadas frías fueron moderadas. La causa de esto último podría ser la presencia del arroyo Las Brusquitas que estaría aportando metales, como el Cd, de las zonas agrarias aledañas. En la población de PMdP, los niveles de acumulación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos policíclicos indican que en el pasado han sido expuestos a algún tipo de derrame de petróleo y que el sitio se encuentra altamente contaminado por estos compuestos. Las concentraciones de metales fueron bajas. Por todo esto se concluye que *B. rodriguezii* tiene

gran capacidad de bioacumulación por lo que es un mejor indicador de contaminación por hidrocarburos y metales que los sedimentos en el área de Mar del Plata. Por otro lado, se estudió por primera vez la acumulación espacio-temporal de microplásticos en los mejillines de las zonas de estudio. La población de PC presenta alta abundancia de microplásticos posiblemente debido a la presencia del emisario proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Mar del Plata que podría estar liberando microplásticos al medio ambiente y en consecuencia acumularse en el mejillín *B. rodriguezii*. En la población de PB, si bien la abundancia de MP fue menor al resto de los sitios, los valores siguen siendo altos para lo reportado en otras especies y, en particular, la alta abundancia durante el invierno (posterior a la temporada de lluvias) nos indica que no debe descuidarse el papel de los sistemas de agua dulce, como ríos y arroyos, como fuente principal de MP en los ambientes marinos. Por todo esto, podemos decir que se ha cumplido y corroborado la hipótesis del primer objetivo. PB es una zona que puede ser utilizada como referencia, pero habría que profundizar los estudios temporales referentes a la acumulación de metales y microplásticos. Además, *B. rodriguezii* es un buen indicador de contaminación por hidrocarburos, metales y microplásticos. Futuros estudios podrían complementarse analizando la acumulación de MP en agua y sedimento para determinar su relación con la bioacumulación en la especie.

Los demás objetivos incluyeron estudiar, a lo largo del año, distintos biomarcadores — a nivel bioquímico, celular y tisular— y respuestas fisiológicas en *B. rodriguezii* en relación al impacto antrópico de los sitios de estudio. Además, establecer cuáles serían las respuestas biológicas y el periodo más apropiado para la utilización de la especie como centinela y bioindicador de contaminación ambiental en áreas costeras de Argentina. Se observaron diferencias en la duración de los periodos de puesta, aunque dentro de cada sitio las poblaciones de machos y hembras, se encontraron en sincronía reproductiva. Los biomarcadores y respuestas fisiológicas útiles para evaluar los efectos de la contaminación en esta especie son aquellas que no presentan diferencias a lo largo de las temporadas, pero si entre los sitios. De las respuestas bioquímicas analizadas, la enzima de biotransformación de fase II (GST) sería un mejor indicador de estrés que CAT y SOD. Asimismo, las respuestas celulares analizadas (acumulación intracelular de LN, LF y BSD) no serían buenos indicadores

en *B. rodriguezii*, mientras que todas las respuestas tisulares (MLR/MET, MET/MDR, VvBAS, CTD y el IH) y fisiológicas (supervivencia al aire y el IC) estudiadas serían buenos indicadores. De los contaminantes medidos, los que más afectarían el estado de salud de *B. rodriguezii* son los hidrocarburos y, en menor medida, los MP. El índice integral de respuesta de biomarcadores es una herramienta útil para integrar todos los parámetros estudiados y evaluar el estrés inducido por los contaminantes. Algunas de las respuestas biológicas analizadas, se encontraron estrechamente relacionadas al ciclo reproductivo de las poblaciones. Se corroboró entonces la hipótesis de que la elección del periodo más apropiado para aplicar programas de biomonitoreo de la contaminación ambiental está determinado por factores como el ciclo reproductivo la especie. En base a todo lo observado, se sugiere realizar monitoreos una vez al año durante la temporada de invierno, usando de valores basales los reportados para PB.

Se puede considerar a *B. rodriguezii* como una especie ideal para ser usada de centinela y bioindicadora del estado de salud ambiental. Es capaz de concentrar los contaminantes presentes en el ambiente sin efectos toxicológicos severos, los cuales pueden evaluarse a través de una amplia gama de respuestas biológicas en distintos niveles de organización, como fue demostrado en el presente trabajo. Además, es abundante, fácil de recolectar y se encuentra presente en un área geográfica extensa. Aun así, quedan estudios pendientes sobre su capacidad para acumular otros contaminantes de origen antrópico, como PCBs, TBT, pesticidas organoclorados, nanopartículas (entre otros) y cuáles serían las respuestas biológicas de la especie frente a ellos. Así, podrían establecerse criterios de evaluación unificados y adaptados para esta especie para implementar programas de monitoreo en la región.

### **Enfoque ambiental integrado para evaluar los efectos biológicos de contaminación en el mitílido *Mytilus galloprovincialis***

En la Sección II se estudiaron dos sitios con distintos tipos de impacto de origen antrópico: Plentzia: sitio de referencia y Arriluze: sitio en una zona portuaria. El primer objetivo fue determinar la disponibilidad de diferentes contaminantes en sedimento su relación con la

bioacumulación en el mitílido *M. galloprovincialis*. Los resultados de este trabajo demuestran que los sedimentos de los dos sitios estudiados no se encuentran contaminados por HAPs (prioritarios totales). Sin embargo, al analizar estos compuestos individualmente la contaminación es de moderada a alta. También se encuentran moderadamente contaminados por PCBs. Plentzia se puede considerar un sitio no contaminado por metales mientras que en Arriluze hay una moderada contaminación de Cd, Cr, Ni y Pb y alta de Cu y Zn. No se detectaron HAPs ni PCBs en los mejillones de ambos sitios, pero sí metales, siendo Arriluze el de mayor concentración, aunque por debajo de los valores reportados para el área. Estos resultados se corresponden con una tendencia decreciente de estos compuestos a lo largo de los años en el área. Así es que la hipótesis planteada sobre la bioacumulación de diferentes contaminantes en los sitios de estudio no se cumplió, al menos para los tres contaminantes analizados. Se sugiere ampliar estos estudios analizando su bioacumulación fuera de la temporada reproductiva para entender si la falta de detección está relacionada con un mayor metabolismo y altas tasas de depuración durante la primavera o a la tendencia de recuperación de calidad ambiental de los estuarios. Por otro lado, el muestreo de este estudio se realizó en el 2021 cuando, debido al COVID-19, regía el confinamiento y las restricciones asociadas a la movilidad o realización de diversas actividades. Sería interesante poder evaluar las concentraciones de contaminantes en las distintas matrices antes, durante y después del periodo de confinamiento para analizar si las restricciones de ciertas actividades pudieron verse reflejadas en las concentraciones registradas.

Los demás objetivos de esta Sección II incluyeron estudiar, distintos biomarcadores — a nivel bioquímico, de daño genético, celular y tisular— y respuestas fisiológicas en *M. galloprovincialis* en relación con el impacto antrópico de los sitios de estudio. Dado que, de los contaminantes medidos en los mejillones ( $\Sigma$ HAPs,  $\Sigma$ PCBs y metales) los únicos detectados fueron los metales, estos podrían ser los que más afectarían el estado de salud de *M. galloprovincialis*. Sin embargo, las concentraciones encontradas de ciertos HAPs individuales y  $\Sigma$ PCBs en los sedimentos podrían generar efectos adversos sobre la biota. Los altos niveles de porcentaje de cola del ADN y frecuencia de brotes nucleares evidencian un efecto de genotoxicidad en Arriluze. En este sitio también se observó una mayor proliferación

peroxisomal mediante los niveles de transcripción del gen *aox1*, aunque no hubo diferencias a nivel bioquímico en la actividad de la enzima AOX1. Sin embargo, los valores de esta enzima en los mejillones de ambos sitios, fueron superiores a reportes previos, indicando que algún contaminante no evaluado podría estar generando su inducción. El resto de los genes analizados no revelaron diferencias entre Plentzia y Arriluze, pero han brindado información valiosa ya que constituyen el primer reporte en ambos sitios de estudio. Es necesario ampliar los estudios transcriptómicos en ambientes naturales y por este motivo se ampliará la selección de genes estudiados en la glándula digestiva. Los biomarcadores tisulares MLR/MET, MET/MDR, y VvBAS, en ambos sitios, presentaron valores mayores que los valores críticos de riesgo toxicológico establecidos por ICES para la especie. Los mejillones de Arriluze evidencian mayor estrés general observado como hiperplasia de células basófilas (VvBAS) pero, contrariamente a lo esperado, los valores de MLR/MET y MET/MDR indicaron atrofia de los túbulos digestivos en Plentzia. En Plentzia se encontró mayor prevalencia de parásitos y al calcular el IH no se observaron diferencias entre los sitios. La incorporación de la parasitosis al análisis del IH permite evidenciar que el daño histopatológico real en los distintos tejidos puede sobreestimarse si no se consideran ciertos factores ambientales de confusión como es la presencia de patógenos. Es por ello que la incorporación (o no) de la parasitosis debe considerarse al calcular el IH cuando la prevalencia e intensidad de parásitos son elevadas. El IC, si bien es un buen indicador del estado de salud general, es también sensible a factores ambientales como la cantidad nutrientes o disponibilidad de alimento, que puede aumentar en sitios contaminados donde la cantidad de materia orgánica es mayor, con lo cual es algo que debe contemplarse en la interpretación de los resultados. Por último, el índice integral de respuesta de biomarcadores nos permitió distinguir a Arriluze como el ambiente con mayor impacto antrópico, pero esto no implica que Plentzia no está sujeta a los efectos del impacto antrópico, sino que es menor. Si bien el IBR/n brinda información sobre la relevancia de ciertas respuestas biológicas, la elección de las más apropiadas es una tarea compleja que requiere un análisis profundo de los diversos factores que afectan a las respuestas. Dado que los efectos observados en el estado de salud de los mejillones podrían deberse a otros contaminantes, se sugiere ampliar el análisis a contaminantes como el TBT,

MP y desorganizadores endocrinos, que podrían explicar las diferencias en la proporción de sexos de los mejillones de Arriluze que fue de 3M:1H. Así como también extender el análisis transcriptómico a otros genes marcadores en el tejido gonadal.

### **Comentarios finales**

En base al trabajo realizado en la presente tesis, destacamos la importancia de realizar estudios integrales de la contaminación ambiental costera que contemplen el análisis no solo de los contaminantes en agua, sedimento y biota, sino también de los efectos adversos que estos pueden generar sobre los organismos. El estado de salud ambiental de diversos sitios del hemisferio norte ha sido monitoreado durante muchos años. Esta tarea, en la actualidad, se ve facilitada por la amplia información disponible sobre: a) los niveles de xenobióticos y compuestos químicos en las distintas matrices, y b) las distintas respuestas fisiológicas y biomarcadores de contaminación en especies centinela. En este sentido, utilizar especies de bivalvos con un amplio rango de distribución como lo es *Mytilus* spp., permite luego la comparación de resultados. Todo esto ha requerido el esfuerzo tanto de la comunidad científica como de los tomadores de decisiones que implementen programas de biomonitoreo. En Argentina, y el resto de la región, el primer desafío es contar criterios claros de evaluación y, el segundo, contar con niveles basales de distintas respuestas biológicas y sus variaciones estacionales. Así, en el análisis del estado de salud ambiental la Bahía de Vizcaya utilizando a *M. galloprovincialis* es más fácil establecer los criterios de evaluación por contarse con un amplio estudio de las respuestas biológicas a distintos niveles y sus variaciones estacionales. Por su parte, el presente estudio, utilizando a *B. rodriguezii* como centinela y bioindicador de contaminación ambiental, brinda los primeros valores de distintas respuestas y sus posibles variaciones. Aunque es necesario ampliar los estudios a otros ambientes y distintos contaminantes, esperamos que esta tesis contribuya a las evaluaciones de riesgo ambiental en Argentina y también en Sudamérica.

## REFERENCIAS

- Aarab, N., Godal, B. F., y Bechmann, R. K. (2011). Seasonal variation of histopathological and histochemical markers of PAH exposure in blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Mar. Environ. Res.* 71, 213-217. doi: 10.1016/j.marenvres.2011.01.005.
- Aarab, N., Pampanin, D. M., Nævdal, A., Øysæd, K. B., Gastaldi, L., y Bechmann, R. K. (2008). Histopathology alterations and histochemistry measurements in mussel, *Mytilus edulis* collected offshore from an aluminium smelter industry (Norway). *Mar. Pollut. Bull.* 57, 569-574. doi: 10.1016/j.marpolbul.2008.01.045.
- Abele, D., Burlando, B., Viarengo, A., y Pörtner, H. O. (1998). Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 120, 425-435. doi: 10.1016/S0305-0491(98)10028-7.
- Adami, M. L., Tablado, A., y López-Gappa, J. (2004). Spatial and temporal variability in intertidal assemblages dominated by the mussel *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846). *Hidrobiología* 520, 49-59. doi: 10.1023/B.
- Adams, S. M., Shepard, K. L., Greeley, M. S., Jimenez, B. D., Ryon, M. G., Shugart, L. R., et al. (1989). The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Mar. Environ. Res.* 28, 459-464. doi: 10.1016/0141-1136(89)90284-5.
- Aebi, H. (1984). Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121-126. doi: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- Agostini, V. O., y Ozorio, C. P. (2018). Caracterização Da Macrofauna De Substratos Consolidados Do Litoral Norte Do Rio Grande Do Sul, Brasil. *Arq. Ciências do Mar* 51, 26. doi: 10.32360/acmar.v51i1.31293.
- Albano, M. J., da Cunha Lana, P., Bremec, C., Elías, R., Martins, C. C., Venturini, N., et al. (2013). Macrobenthos and multi-molecular markers as indicators of environmental contamination in a South American port (Mar del Plata, Southwest Atlantic). *Mar. Pollut. Bull.* 73, 102-114. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.05.032.
- Albano, M. J., y Obenat, S. M. (2009). Assemblage of benthic macrofauna in the aggregates of the tubicolous worm *Phyllochaetopterus socialis* in the. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 89, 1099-1108. doi: 10.1017/S0025315409000472.
- Arias, A. H., Spetter, C. V., Freije, R. H., y Marcovecchio, J. E. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons in water, mussels (*Brachidontes* sp., *Tagelus* sp.) and fish (*Odontesthes* sp.) from Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 85, 67-81. doi: 10.1016/j.ecss.2009.06.008.
- Aronson, R. B., Thatje, S., McClintock, J. B., y Hughes, K. A. (2011). Anthropogenic impacts on marine ecosystems in Antarctica. 1223, 82-107. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05926.x.
- Arribas, L. P., Bagur, M., Klein, E., Penchaszadeh, P. E., y Palomo, M. G. (2013). Geographic distribution of two mussel species and associated assemblages along the northern Argentinean coast. *Aquat. Biol.* 18, 91-103. doi: 10.3354/ab00495.
- Arribas, L. P., Bagur, M., Gutiérrez, J. L., y Palomo, M. G. (2015). Matching spatial scales of variation in mussel recruitment and adult densities across southwestern Atlantic rocky shores. *J. Sea Res.* 95, 16-21. doi: 10.1016/j.seares.2014.10.015.

- Arrighetti, F., Landro, S. M., Lambre, M. E., Penchaszadeh, P. E., y Teso, V. (2019). Multiple-biomarker approach in the assessment of the health status of a novel sentinel mussel *Brachidontes rodriguezii* in a harbor area. *Mar. Pollut. Bull.* 140, 451-461. doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.02.002.
- Astorga, M. P., Cardenas, L., y Vargas, J. (2015). Phylogenetic approaches to delimit genetic lineages of the *Mytilus* Complex of South America: How many species are there? *J. Shellfish Res.* 34, 919-930. doi: 10.2983/035.034.0322.
- ATSDR (1995). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons.
- Au, D. W. T. (2004). The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 817-834. doi: 10.1016/j.marpolbul.2004.02.032.
- Azpeitia, K., Ortiz-Zarragoitia, Revilla, M., y Mendiola, D. (2017). Variability of the reproductive cycle in estuarine and coastal populations of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. from the SE Bay of Biscay (Basque Country). *Int. Aquat. Res.* 9, 329-350. doi: 10.1007/s40071-017-0180-3.
- Balbi, T., Franzellitti, S., Fabbri, R., Montagna, M., Fabbri, E., y Canesi, L. (2016). Impact of bisphenol A (BPA) on early embryo development in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: Effects on gene transcription. *Environ. Pollut.* 218, 996-1004. doi: 10.1016/j.envpol.2016.08.050.
- Banni, M., Negri, A., Mignone, F., Boussetta, H., Viarengo, A., y Dondero, F. (2011). Gene Expression Rhythms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) across an Annual Cycle. *PLoS One* 6, e18904. doi: 10.1371/journal.pone.0018904.
- Baršienė, J., Bjornstad, A., Rybakovas, A., Šyvokienė, J., y Andreikėnaitė, L. (2010). Environmental genotoxicity and cytotoxicity studies in mussels and fish inhabiting northern Atlantic zones impacted by aluminum industry. *Ekologija* 56, 116-123. doi: 10.2478/v10055-010-0017-5.
- Baršienė, J., Lyons, B., Rybakovas, A., MartínezGómez, C., Andreikenaite, Laura Brooks, S., y Maes, T. (2012). «Background document: micronucleus assay as a tool for assessing cytogenetic/DNA damage in marine organisms», en *Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. ICES Cooperative research report n° 315*, 71-83.
- Bartolomé, L., Etxebarria, N., Martínez-Arkarazo, I., Raposo, J. C., Usobiaga, A., Zuloaga, O., et al. (2010). Distribution of organic microcontaminants, butyltins, and metals in mussels from the estuary of Bilbao. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 244-254. doi: 10.1007/s00244-009-9458-9.
- Baumard, P., Budzinski, H., y Garrigues, P. (1998a). Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the Western Mediterranean Sea. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 765-776.
- Baumard, P., Budzinski, H., Michon, Q., Garrigues, P., Burgeot, T., y Bellocq, J. (1998b). Origin and Bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from Mussel and Sediment. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 47, 77-90.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Narbonne, J. F., Burgeot, T., Michel, X., et al. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Mar. Environ. Res.* 47, 415-439.
- Beeby, A. (2001). What do sentinels stand for? *Environ. Pollut.* 112, 285-298. doi: 10.1016/S0269-7491(00)00038-5.
- Beliaeff, B., y Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1316-1322. doi: 10.1002/etc.5620210629.
- Belz, C. E., Simone, L. R. L., Silveira Júnior, N., Baggio, R. A., Gernet, M. de V., y Birckolz, C. J. (2020).

- First record of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, mytilidae) in Brazil. *Pap. Avulsos Zool.* 60, 0-4. doi: 10.11606/1807-0205/2020.60.07.
- Belzunce, M. J., Solaun, O., Oreja, J. A. G., Millán, E., y Pérez, V. (2007). «Contaminants in sediments», en *Oceanography and Marine Environment of the Basque Country* (Elsevier Oceanography Series), 283-315.
- Benali, I., Boutiba, Z., Merabet, A., y Chèvre, N. (2015). Integrated use of biomarkers and condition indices in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) for monitoring pollution and development of biomarker index to assess the potential toxic of coastal sites. *Mar. Pollut. Bull.* 95, 385-394. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.03.041.
- Beninger, P. G. (2017). *Caveat observator*: the many faces of pre-spawning atresia in marine bivalve reproductive cycles. *Mar. Biol.* 164. doi: 10.1007/s00227-017-3194-x.
- Benito, D., Niederwanger, M., Izagirre, U., Dallinger, R., y Soto, M. (2017). Successive onset of molecular, cellular and tissue-specific responses in midgut gland of *Littorina littorea* exposed to sub-lethal Cadmium concentrations. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1815. doi: 10.3390/ijms18081815.
- Besada, V., Andrade, J. M., Schultze, F., Fumega, J., Cambeiro, B., y González, J. J. (2008). Statistical comparison of trace metal concentrations in wild mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in selected sites of Galicia and Gulf of Biscay (Spain). *J. Mar. Syst.* 72, 320-331. doi: 10.1016/j.jmarsys.2007.03.012.
- Besada, V., Sericano, J. L., y Schultze, F. (2014). An assessment of two decades of trace metals monitoring in wild mussels from the Northwest Atlantic and Cantabrian coastal areas of Spain, 1991-2011. *Environ. Int.* 71, 1-12. doi: 10.1016/j.envint.2014.05.024.
- Bessa, F., Frias, J., Kögel, T., Lusher, A., Andrade, J. M., Antunes, J., et al. (2019). Harmonized protocol for monitoring microplastics in biota. JPI-Oceans BASEMAN project. doi: 10.13140/RG.2.2.28588.72321/1.
- Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., et al. (2017). Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review. *Mar. Environ. Res.* 130, 338-365. doi: 10.1016/j.marenvres.2017.07.024.
- Bignell, J. P., Dodge, M. J., Feist, S. W., Lyons, B., Martin, P. D., Taylor, N. G. H., et al. (2008). Mussel histopathology: Effects of season, disease and species. *Aquat. Biol.* 2, 1-15. doi: 10.3354/ab00031.
- Bignell, J., Cajaraville, M., y Marigómez, I. (2012). «Background document: histopathology of mussels (*Mytilus* spp.) for health assessment in biological effects monitoring», en *Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. ICES Cooperative research report n° 315*, eds. I. M. Davies y A. D. Vethaak, 111-120.
- Bissen, R., y Chawchai, S. (2020). Microplastics on beaches along the eastern Gulf of Thailand – A preliminary study. *Mar. Pollut. Bull.* 157, 111345. doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111345.
- Blaise, C., Gagné, F., y Burgeot, T. (2017). Three simple biomarkers useful in conducting water quality assessments with bivalve mollusks. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 27662-27669. doi: 10.1007/s11356-016-6908-6.
- Blanco-Rayón, E., Guilhermino, L., Marigómez, I., y Izagirre, U. (2019). Collection and transport of sentinel mussels in biomarker-based coastal pollution monitoring: Current flaws and reliable practices. *Ecol. Indic.* 103, 722-734. doi: 10.1016/j.ecolind.2019.04.041.

- Blanco-Rayón, E., Ivanina, A. V., Sokolova, I. M., Marigómez, I., y Izagirre, U. (2020). Sex and sex-related differences in gamete development progression impinge on biomarker responsiveness in sentinel mussels. *Sci. Total Environ.* 740, 140178. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140178.
- Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., et al. (2008). Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquat. Toxicol.* 89, 257-266. doi: 10.1016/j.aquatox.2008.07.011.
- Bolognesi, C., y Fenech, M. (2012). Mussel micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 7, 1125-1137. doi: 10.1038/nprot.2012.043.
- Bolognesi, C., Parrini, M., Roggieri, P., Ercolini, C., y Pellegrino, C. (1992). «Carcinogenic and mutagenic pollutants: Impact on marine organisms», en *UNEP/FAO/IOC: Proceedings of the FAO/UNEP/IOC workshop on the biological effects of pollutants on marine organisms. MAP Technical Reports Series n°69, UNEP.*, ed. G. P. Gabrielides, 113-122.
- Bolognesi, C., Landini, E., Roggieri, P., Fabbri, R., y Viarengo, A. (1999). Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: Experimental studies. *Environ. Mol. Mutagen.* 33, 287-292. doi: 10.1002/(SICI)1098-2280(1999)33:4<287::AID-EM5>3.0.CO;2-G.
- Borja, Á., Dauer, D. M., Elliott, M., y Simenstad, C. A. (2010). Medium-and long-term recovery of estuarine and coastal ecosystems: Patterns, rates and restoration effectiveness. *Estuaries and Coasts* 33, 1249-1260. doi: 10.1007/s12237-010-9347-5.
- Borthagaray, A. I., y Carranza, A. (2007). Mussels as ecosystem engineers: Their contribution to species richness in a rocky littoral community. *Acta Oecologica* 31, 243-250. doi: 10.1016/j.actao.2006.10.008.
- Bouvet, Y., Desse, R.-P., Morell, P., y Villar, M. del C. (2005). Mar del plata (Argentina): la ciudad balnearia de los porteños en el atlántico suroccidental. *Investig. Geográficas* 36, 61-80.
- Bouxin, H. (1956). Observations sur le frai de *Mytilus edulis* Var. *galloprovincialis* (Lmk). Dates précises de frai. Facteurs provoquant l'émission de produits génitaux. en *International Council for the Exploration of the Sea. Special Scientific Meeting «Oyster and Mussel Culture» n°36*, 43-6.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254. doi: 10.1016/j.cj.2017.04.003.
- Branch, G. M., y Steffani, N. C. (2004). Can we predict the effects of alien species? A case-history of the invasion of South Africa by *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 300, 189-215. doi: 10.1016/j.jembe.2003.12.007.
- Bráte, I. L. N., Blázquez, M., Brooks, S. J., y Thomas, K. V (2018a). Weathering impacts the uptake of polyethylene microparticles from toothpaste in Mediterranean mussels (*M. galloprovincialis*). *Sci. Total Environ.* 626, 1310-1318. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.141.
- Bráte, I. L. N., Hurley, R., Iversen, K., Beyer, J., Thomas, K. V, Steindal, C. C., et al. (2018b). *Mytilus* spp. as sentinels for monitoring microplastic pollution in Norwegian coastal waters: A qualitative and quantitative study. *Environ. Pollut.* 243, 383-393. doi: 10.1016/j.envpol.2018.08.077.
- Briaudeau, T., Zorita, I., Cuevas, N., Franco, J., Marigómez, I., y Izagirre, U. (2019). Multi-annual survey of health status disturbance in the Bilbao estuary (Bay of Biscay) based on sediment chemistry and juvenile sole (*Solea* spp.) histopathology. *Mar. Pollut. Bull.* 145, 126-137. doi:

10.1016/j.marpolbul.2019.05.034.

- Briaudeau, T., Zorita, I., Izagirre, U., y Marigómez, I. (2020). Biological responses and toxicopathic effects elicited in *Solea senegalensis* juveniles on exposure to contaminated sediments under laboratory conditions. *Sci. Total Environ.* 731, 138849. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138849.
- Broeg, K., y Lehtonen, K. K. (2006). Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: Integrated assessment of a multi-biomarker approach. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 508-522. doi: 10.1016/j.marpolbul.2006.02.004.
- Brooks, S., Harman, C., Zaldibar, B., Izagirre, U., Glette, T., y Marigómez, I. (2011). Integrated biomarker assessment of the effects exerted by treated produced water from an onshore natural gas processing plant in the North Sea on the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 327-339. doi: 10.1016/j.marpolbul.2010.10.007.
- Brooks, S., Harman, C., Soto, M., Cancio, I., Glette, T., y Marigómez, I. (2012). Integrated coastal monitoring of a gas processing plant using native and caged mussels. *Sci. Total Environ.* 426, 375-386. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.03.059.
- Brooks, S. J., Farnen, E., Heier, L. S., Blanco-Rayón, E., y Izagirre, U. (2015). Differences in copper bioaccumulation and biological responses in three *Mytilus* species. *Aquat. Toxicol.* 160, 1-12. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.12.018.
- Brown, T. M., y Takada, H. (2017). Indicators of Marine Pollution in the North Pacific Ocean. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 73, 171-175. doi: 10.1007/s00244-017-0424-7.
- Browne, M. A. (2015). «Sources and pathways of microplastics to habitats», en *Marine anthropogenic litter*, eds. M. Bergmann, L. Gutow, y M. Klages.
- Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., y Thompson, R. C. (2008). Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environ. Sci. Technol.* 42, 5026-5031.
- Browne, M. A., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., et al. (2011). Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: Sources and sinks. *Environ. Sci. Technol.* 45, 9175-9179. doi: 10.1021/es201811s.
- Browne, M. A., Niven, S. J., Galloway, T. S., Rowland, S. J., y Thompson, R. C. (2013). Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Curr. Biol.* 23, 2388-2392. doi: 10.1016/j.cub.2013.10.012.
- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., y Shostak, A. W. (1997). Parasitology meets Ecology on its own terms : Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 83, 575-583.
- Buzzi, N. S., y Marcovecchio, J. E. (2018). Heavy metal concentrations in sediments and in mussels from Argentinean coastal environments, South America. *Environ. Earth Sci.* 77, 1-13. doi: 10.1007/s12665-018-7496-1.
- Buzzi, N. S., Oliva, A. L., Arias, A. H., y Marcovecchio, J. E. (2017). Assessment of trace metal accumulation in native mussels (*Brachidontes rodriguezii*) from a South American temperate estuary. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 15781-15793. doi: 10.1007/s11356-017-9237-5.
- Cáceres-Martínez, J., y Figueras, A. (1998). Long-term survey on wild and cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) reproductive cycles in the Ria de Vigo (NW Spain). *Aquaculture* 162, 141-156. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00210-5.
- Cajaraville, M. P., Marigómez, J. A., Díez, G., y Angulo, E. (1992). Comparative effects of the water

- accommodated fraction of three oils on mussels-2. Quantitative alterations in the structure of the digestive tubules. *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp.* 102, 113-123. doi: 10.1016/0742-8413(92)90052-9.
- Cajaraville, M. P., Marigómez, I., y Angulo, E. (1993). Correlation between cellular and organismic responses to oil-induced environmental stress in mussels. *Sci. Total Environ.* 134, 1353-1371
- Cajaraville, M. P., Etxeberria, M., y Marigomez, I. (1995). Lysosomes as cellular markers of environmental pollution: Time- and dose-dependent responses of the digestive lysosomal system of mussels after petroleum hydrocarbon exposure. *Environ. Toxicol. Water Qual. A Int. J.* 10, 1-8.
- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., y Viarengo, A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295-311. doi: 10.1016/S0048-9697(99)00499-4.
- Cajaraville, M. P., Cancio, I., Ibabe, A., y Orbea, A. (2003). Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment. *Microsc. Res. Tech.* 61, 191-202. doi: 10.1002/jemt.10329.
- Cajaraville, M. P., Garmendia, L., Orbea, A., Werding, R., Gómez-Mendikute, A., Izagirre, U., et al. (2006). Signs of recovery of mussels health two years after the Prestige oil spill. *Mar. Environ. Res.* 62, 337-341. doi: 10.1016/j.marenvres.2006.04.048.
- Cajaraville, M. P., Orive, E., Villate, F., Laza-Martínez, A., Uriarte, I., Garmendia, L., et al. (2016). Health status of the Bilbao estuary: A review of data from a multidisciplinary approach. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 179, 124-134. doi: 10.1016/j.ecss.2016.01.013.
- Cancio, I., Cajaraville, M. P., Orbea, A., y Marigómez, I. (1997). Peroxisome proliferation in the digestive epithelium of mussels exposed to the water accommodated fraction of three oils. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 117, 233-242.
- Cancio, I., Ibabe, A., y Cajaraville, M. P. (1999). Seasonal variation of peroxisomal enzyme activities and peroxisomal structure in mussels *Mytilus galloprovincialis* and its relationship with the lipid content. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 123, 135-144. doi: 10.1016/S0742-8413(99)00019-5.
- Carella, F., Aceto, S., Mangoni, O., Mollica, M. P., Cavaliere, G., Trinchese, G., et al. (2018). Assessment of the health status of mussels *Mytilus galloprovincialis* along the campania coastal areas: A multidisciplinary approach. *Front. Physiol.* 9, 1-16. doi: 10.3389/fphys.2018.00683.
- CEE (2002). Comunidad Económica Europea. Reglamento N° 466/2001.
- Chandurvelan, R., Marsden, I. D., Glover, C. N., y Gaw, S. (2015). Assessment of a mussel as a metal bioindicator of coastal contamination: Relationships between metal bioaccumulation and multiple biomarker responses. *Sci. Total Environ.* 511, 663-675. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.12.064.
- Chapman, L. (2007). Transport and climate change : a review. *J. Transp. Geog.* 15(5), 354-367. 15, 354-367. doi: 10.1016/j.jtrangeo.2006.11.008.
- Claxton, L. D., Houk, V. S., y Hughes, T. J. (1998). Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Rev. Mutat. Res.* 410, 237-243.
- Cole, M., y Galloway, T. S. (2015). Ingestion of nanoplastics and microplastics by Pacific oyster larvae. *Environmental Sci. Technol.* 49, 14625-14632. doi: 10.1021/acs.est.5b04099.
- Collins, R., Brack, W., Lützhøft, H.-C. H., Eriksson, E., Bjerregaard, P., Boxall, A., et al. (2011). Hazardous substances in Europe's fresh and marine waters: An overview. *Eur. Environ. Agency. EEA Tech. Rep. n° 8/2011*, 65. doi: 10.2800/78305.

- Commendatore, M. G., y Esteves, J. L. (2007). An assessment of oil pollution in the coastal zone of Patagonia, Argentina. *Environ. Manage.* 40, 814-821. doi: 10.1007/s00267-005-0221-3.
- Commendatore, M. G., Esteves, J. L., y Colombo, J. C. (2000). Hydrocarbons in coastal sediments of Patagonia, Argentina: Levels and probable sources. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 989-998. doi: 10.1016/S0025-326X(00)00042-4.
- Cortada, U., y Collins, M. (2013). The nature and contamination of sediments in the Plentzia estuary (Biscay province, Spain). *Geogaceta* 54, 147-150.
- Costa, P. M., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., et al. (2011). Estuarine ecological risk based on hepatic histopathological indices from laboratory and in situ tested fish. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 55-65. doi: 10.1016/j.marpolbul.2010.09.009.
- Costa, P. M., Carreira, S., Costa, M. H., y Caeiro, S. (2013). Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality. *Aquat. Toxicol.* 126, 442-454. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.08.013.
- Cremonte, F. (2011). «Enfermedades de moluscos bivalvos de interés comercial causadas por metazoos», en *Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en Acuicultura*, 331-385.
- Cuello, G. V., Llanos, E. N., Garaffo, G. V, y Jaubet, M. L. (2019). Emisario submarino de Mar del Plata (Argentina): ¿Cómo impactó su construcción en la comunidad bentónica intermareal? *Ecol. Austral* 29, 028-040. doi: 10.25260/ea.19.29.1.0.771.
- Cuevas, J., Martín, J., y Bastida, R. (2006). Benthic community changes in a patagonian intertidal: a forty years later comparison. *Thalassas* 22, 29-37. Available at: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2216872&orden=128390&info=link>.
- Cuevas, N., Zorita, I., Costa, P. M., Franco, J., y Larreta, J. (2015). Development of histopathological indices in the digestive gland and gonad of mussels: Integration with contamination levels and effects of confounding factors. *Aquat. Toxicol.* 162, 152-164. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.03.011.
- Culling, C. F. (1974). *Handbook of histopathological and histochemical techniques*. London: Butterworths doi: 10.1016/B978-0-407-72901-8.50045-7.
- Daguin, C., y Borsa, P. (2000). Genetic relationships of *Mytilus galloprovincialis* Lamarck populations worldwide: Evidence from nuclear-DNA markers. *Geol. Soc. Spec. Publ.* 177, 389-397. doi: 10.1144/GSL.SP.2000.177.01.26.
- Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Loquès, F., Roméo, M., y Salbert, V. (2007). Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere* 66, 574-583. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.05.032.
- Danscher, G. (1984). Autometallography: A new technique for light and electron microscope visualization of metals in biological tissues (gold, silver, metal sulphides and metal selenides). *Histochemistry* 81, 331-335.
- Davies, I. M., y Vethaak, D. (2012). *Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. ICES Cooperative Research Report n° 315*.
- Davies, I. M., Gubbins, M., Hylland, K., Thain, J., Maes, T., Martínez-Gómez, C., et al. (2012). «Technical annex: assessment criteria for biological effects measurements», en *Davies, I. M., y Vethaak, D. (2012). Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. ICES Cooperative Research Report n° 315.*, eds. I. Davies y D. Vethaak, 209-212.
- de los Ríos, A., Juanes, J. A., Ortiz-Zarragoitia, M., López de Alda, M., Barceló, D., y Cajaraville, M. P.

- (2012). Assessment of the effects of a marine urban outfall discharge on caged mussels using chemical and biomarker analysis. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 563-573. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.12.018.
- de los Ríos, A., Pérez, L., Ortiz-zarragoitia, M., Serrano, T., Barbero, M. C., Echavarri-erasun, B., et al. (2013). Assessing the effects of treated and untreated urban discharges to estuarine and coastal waters applying selected biomarkers on caged mussels. *Mar. Pollut. Bull.* 77, 251-265. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.09.050.
- de los Ríos, A., Echavarri-Erasun, B., Lacorte, S., Sánchez-Ávila, J., De Jonge, M., Blust, R., et al. (2016a). Relationships between lines of evidence of pollution in estuarine areas: Linking contaminant levels with biomarker responses in mussels and with structure of macroinvertebrate benthic communities. *Mar. Environ. Res.* 121, 49-63. doi: 10.1016/j.marenvres.2016.02.012.
- de los Ríos, A., Pérez, L., Echavarri-Erasun, B., Serrano, T., Barbero, M. C., Ortiz-Zarragoitia, M., et al. (2016b). Measuring biological responses at different levels of organisation to assess the effects of diffuse contamination derived from harbour and industrial activities in estuarine areas. *Mar. Pollut. Bull.* 103, 301-312. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.11.056.
- de los Ríos, A., Echavarri-Erasun, B., Dévier, M. H., Le Menach, K., Budzinski, H., Ortiz-Zarragoitia, M., et al. (2018). Assessment of the effects of discontinuous sources of contamination through biomarker analyses on caged mussels. *Sci. Total Environ.* 634, 116-126. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.297.
- De Marco, S. G., Marcovecchio, J. E., Vallina, M., Barral, M. P., Bo, M. J., Camino, M., et al. (2020). The influence of human activities on Pampean streams catchment: a biogeochemical approach. *Environ. Earth Sci.* 79, 1-16. doi: 10.1007/s12665-019-8676-3.
- Dehaut, A., Cassone, A., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., et al. (2016). Microplastics in seafood : Benchmark protocol for their extraction and characterization. 215, 223-233. doi: 10.1016/j.envpol.2016.05.018.
- Devier, M. H., Augagneur, S., Budzinski, H., Le Menach, K., Pascal, M., Narbonne, J. F., et al. (2005). One-year monitoring survey of organic compounds (PAHs, PCBs, TBT), heavy metals and biomarkers in blue mussels from the Arcachon Bay, France. *J. Environ. Monit.* 7, 224-240. doi: 10.1039/b409577d.
- Di Salvatore, P., Calcagno, J. A., Ortíz, N., Ríos de Molina, M. del C., y Sabatini, S. E. (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. doi: 10.1016/j.marenvres.2013.10.004.
- Díaz-Jaramillo, M., Pinoni, S., Matos, B., Marcoval, A., y Diniz, M. S. (2020). Stress responses to warming in the mussel *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1842) from different environmental scenarios. *Aquat. Toxicol.* 228, 105647. doi: 10.1016/j.aquatox.2020.105647.
- Digka, N., Tsangaris, C., Torre, M., Anastasopoulou, A., y Zeri, C. (2018). Microplastics in mussels and fish from the Northern Ionian Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 135, 30-40. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.06.063.
- Domouhtsidou, G. P., y Dimitriadis, V. K. (2001). Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. *Environ. Pollut.* 115, 123-137.

- Dondero, F., Piacentini, L., Banni, M., Rebelo, M., Burlando, B., y Viarengo, A. (2005). Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. *Gene* 345, 259-270. doi: 10.1016/j.gene.2004.11.031.
- Duarte, C. A., Giarratano, E., Amin, O. A., y Comoglio, L. I. (2011). Heavy metal concentrations and biomarkers of oxidative stress in native mussels (*Mytilus edulis chilensis*) from Beagle Channel coast (Tierra del Fuego, Argentina). *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1895-1904. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.05.031.
- Duroudier, N., Katsumiti, A., Mikolaczyk, M., Schäfer, J., Bilbao, E., y Cajaraville, M. P. (2021). Cell and tissue level responses in mussels *Mytilus galloprovincialis* dietarily exposed to PVP/PEI coated Ag nanoparticles at two seasons. *Sci. Total Environ.* 750, 141303. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141303.
- Duroudier, N., Katsumiti, A., Mikolaczyk, M., Schäfer, J., Bilbao, E., y Cajaraville, M. P. (2019a). Dietary exposure of mussels to PVP/PEI coated Ag nanoparticles causes Ag accumulation in adults and abnormal embryo development in their offspring. *Sci. Total Environ.* 655, 48-60. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.181.
- Duroudier, N., Markaide, P., Cajaraville, M. P., y Bilbao, E. (2019b). Season influences the transcriptomic effects of dietary exposure to PVP/PEI coated Ag nanoparticles on mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 222, 19-30. doi: 10.1016/j.cbpc.2019.03.010.
- Elías, R., Rivero, M. S., y Vallarino, E. A. (2003). Sewage impact on the composition and distribution of polychaeta associated to intertidal mussel beds of the Mar del Plata rocky shore, Argentina. 93, 309-318.
- Elías, R., Vallarino, E. A., Scagliola, M., y Isla, F. I. (2004). Macrobenthic Distribution Patterns at a Sewage Disposal Site in the Inner Shelf Macrobenthic Distribution Patterns at a Sewage Disposal Site in the Inner Shelf off Mar Del Plata ( SW Atlantic )\*. *J. Coast. Res.* 20, 1176-1182. doi: 10.2112/03-0020R.1.
- Elías, R., Rivero, M. S., Palacios, J. R., y Vallarino, E. A. (2006). Sewage-induced disturbance on polychaetes inhabiting intertidal mussel beds of *Brachidontes rodriguezii* off Mar del Plata (SW Atlantic, Argentina ). *Sci. Mar.* 70, 187-196.
- Elías, R., Rivero, M. S., Jaubet, M. L., y Vallarino, E. A. (2009). Do treatments of sewage plants really work? The intertidal mussels' community of the southwestern Atlantic shore (38°S, 57°W) as a case study. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 44, 357-368. doi: 10.4067/S0718-19572009000200009.
- Elías, R., Sabatini, S., y Dávila, C. (2022). The response of the natural and sewage-impacted intertidal epilithic community of the SW Atlantic to pulse (before/after summer) and chronic sewage discharges in the 1997-2014 period. *Mar. Fish. Sci.* 35, 333-371. doi: 10.47193/mafis.35320220109014.
- EPA (2013). <https://www.epa.gov/chemical-research/research-endocrine-disruptors>.
- Faggio, C., Tsarpali, V., y Dailianis, S. (2018). Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: An overview. *Sci. Total Environ.* 636, 220-229. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.264.
- FAO (2009). «*Mytilus galloprovincialis*», en *Cultured aquatic species fact sheets. Text by Figueras, A. Edited and compiled by Valerio Crespi and Michael New* doi: 10.30888/2415-7538.2018-08-01-033.

- Farrington, J. W., Goldberg, E. D., Risebrough, R. W., Martin, J. H., y Bowen, V. T. (1983). U . S . “ Mussel Watch ” 1976-1978 : An Overview of the Trace-Metal , DDE , PCB, Hydrocarbon, and Artificial Radionuclide Data. 490-496.
- Farrington, J. W., Tripp, B. W., Tanabe, S., Subramanian, A., Sericano, J. L., Wade, T. L., et al. (2016). Edward D. Goldberg’s proposal of “the Mussel Watch”: Reflections after 40 years. *Mar. Pollut. Bull.* 110, 501-510. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.05.074.
- Fernández, B., Campillo, J. A., Martínez-Gómez, C., y Benedicto, J. (2010). Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. *Aquat. Toxicol.* 99, 186-197. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.04.013.
- Fernández Severini, M. D., Villagran, D. M., Buzzi, N. S., y Sartor, G. C. (2019). Microplastics in oysters (*Crassostrea gigas*) and water at the Bahía Blanca Estuary (Southwestern Atlantic): An emerging issue of global concern. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 32, 100829. doi: 10.1016/j.rsma.2019.100829.
- Franco, J., Borja, A., Solaun, O., y Pérez, V. (2002). Heavy metals in molluscs from the Basque Coast (Northern Spain): Results from an 11-year monitoring programme. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 973-976. doi: 10.1016/S0025-326X(02)00122-4.
- Galloway, T. S., Cole, M., y Lewis, C. (2017). Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. *Nat. Ecol. Evol.* 1, 1-8. doi: 10.1038/s41559-017-0116.
- Garaffo, G. V., Jaubet, M. L., N, L. E., Saracho Bottero, M. A., y Elías, R. (2018). Assessing functional diversity of macrobenthic assemblages in sewage-affected intertidal shores. *Aquat. Res.* 10, 333-347. doi: 10.1007/s40071-018-0211-8.
- Garmendia, L., Soto, M., Cajaraville, M. P., y Marigómez, I. (2010). Seasonality in cell and tissue-level biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: Relevance for long-term pollution monitoring. *Aquat. Biol.* 9, 203-219. doi: 10.3354/ab00245.
- Garmendia, L., Izagirre, U., Cajaraville, M. P., y Marigómez, I. (2011a). Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the Prestige oil spill in Galicia and the Bay of Biscay: Lysosomal responses. *J. Environ. Monit.* 13, 901-914. doi: 10.1039/c0em00409j.
- Garmendia, L., Soto, M., Vicario, U., Kim, Y., Cajaraville, M. P., y Marigómez, I. (2011b). Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the Prestige oil spill in Galicia and Bay of Biscay: Tissue-level biomarkers and histopathology. *J. Environ. Monit.* 13, 915-932. doi: 10.1039/c0em00410c.
- GBIF.org (21 February 2023) GBIF Occurrence Download (2023). doi: 10.15468/dl.ppqyt9.
- Gedik, K., y Eryas, A. R. (2020). Microplastic pollution profile of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected along the Turkish coasts. *Chemosphere* 260, 127570. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127570.
- Geller, J. B., Carlton, J. T., y Powers, D. A. (1994). PCR-based detection of mtDNA haplotypes of native and invading mussels on the northeastern Pacific coast: latitudinal pattern of invasion. *Mar. Biol.* 119, 243-249. doi: 10.1007/BF00349563.
- GESAMP (1982). (IMO/FAO/IJNESCO/WMO/IAEA/UN/IJNEP). The health of the oceans. *Reports Stud. GESAMP* 15, 118.
- GESAMP (2015). “Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment”. Kershaw, P.J., ed. (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP.

- Reports Stud. GESAMP* 90, 96. doi: 10.13140/RG.2.1.3803.7925.
- Giarratano, E., y Amin, O. A. (2010). Heavy metals monitoring in the southernmost mussel farm of the world (Beagle Channel, Argentina). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1378-1384. doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.06.023.
- Giarratano, E., Duarte, C. A., y Amin, O. A. (2010). Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal waters of the Beagle Channel. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 270-279. doi: 10.1016/j.ecoenv.2009.10.009.
- Giarratano, E., Gil, M. N., y Malanga, G. (2011). Seasonal and pollution-induced variations in biomarkers of transplanted mussels within the Beagle Channel. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1337-1344. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.03.037.
- Giarratano, E., Gil, M. N., y Malanga, G. (2014). Biomarkers of environmental stress in gills of ribbed mussel *Aulacomya atra atra* (Nuevo Gulf, Northern Patagonia). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 107, 111-119. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.05.003.
- Gil, M. N., Torres, A., Harvey, M., y Esteves, J. L. (2006). Metales pesados en organismos marinos de la zona costera de la Patagonia argentina continental. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 41, 167-176.
- Goldberg, E. D. (1975). The Mussel Watch- A First Step in Global Marine Monitoring. 6, 1975.
- González-Soto, N., Campos, L., Navarro, E., Bilbao, E., Guilhermino, L., y Cajaraville, M. P. (2022). Effects of microplastics alone or with sorbed oil compounds from the water accommodated fraction of a North Sea crude oil on marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Sci. Total Environ.* 851, 157999. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.157999.
- Gonzalez, J. A., Coombes, M. A., Palomo, M. G., Isla, F. I., Soria, S. A., y Gutiérrez, J. L. (2021). Enhanced Weathering and Erosion of a Cohesive Shore Platform Following the Experimental Removal of Mussels. 8, 1-13. doi: 10.3389/fmars.2021.756016.
- Granby, K., y Spliid, N. H. (1995). Hydrocarbons and organochlorines in common mussels from the Kattegat and the Belts and their relation to condition indices. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 74-82.
- Grant, S. W., y Cherry, M. I. (1985). *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in Southern Africa. *J. Exp. Biol. Ecol.* 90, 179-191.
- Guerlet, E., Ledy, K., y Giambérini, L. (2006). Field application of a set of cellular biomarkers in the digestive gland of the freshwater snail *Radix peregra* (Gastropoda, Pulmonata). *Aquat. Toxicol.* 77, 19-32. doi: 10.1016/j.aquatox.2005.10.012.
- Guerrero, R. A., y Piola, A. R. (1997). «Masas de agua en la plataforma continental», en *Instituto nacional de investigación y desarrollo pesquero*, ed. E. E. Boschi, 107-118.
- Guo, X., y Wang, J. (2019). The chemical behaviors of microplastics in marine environment: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 142, 1-14. doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.03.019.
- Gutiérrez, J. L., Palomo, M. G., Bagur, M., Arribas, L. P., y Soria, S. A. (2015). Wave action limits crowding in an intertidal mussel. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 518, 153-163. doi: 10.3354/meps11086.
- Gutiérrez, J. L., Bagur, M., Arribas, L. P., y Palomo, M. G. (2018). Does rock type account for variation in mussel attachment strength? A test with *Brachidontes rodriguezii* in the southwestern Atlantic. *Helgol. Mar. Res.* 72, 10. doi: 10.1186/s10152-018-0514-6.
- Gutiérrez, J. L., Bagur, M., y Palomo, M. G. (2019). Algal epibionts as co-engineers in mussel beds: Effects on abiotic conditions and mobile interstitial invertebrates. *Diversity* 11, 17. doi: 10.3390/d11020017.

- Habig, W. H., Pabst, M. J., y Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139. doi: 10.1016/s0021-9258(19)42083-8.
- Häder, D., Banaszak, A. T., Villafañe, V. E., Narvarte, M. A., González, R. A., y Helbling, E. W. (2020). Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems Emerging problems with global implications. *Sci. Total Environ.* 713, 136586. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136586.
- Hagger, J. A., Depledge, M. H., y Galloway, T. S. (2005). Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 811-816. doi: 10.1016/j.marpolbul.2005.06.044.
- Hallmann, A., Smolarz, K., Konieczna, L., Zabrzeńska, S., Belka, M., y Baczek, T. (2016). LC-MS measurment of free steroids in mussels (*Mytilus trossulus*) from the southern Baltic Sea. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 117, 311-315. doi: 10.1016/j.jpba.2015.09.013.
- Halpern, B. S., Walbridge, S., Selkoe, K. A., Kappel, C. V, Micheli, F., D'Agrosa, C., et al. (2008). A global map of human impact on marine ecosystems. 319, 948-953.
- Hamed, M. A., y Emara, A. M. (2006). Marine molluscs as biomonitors for heavy metal levels in the Gulf of Suez, Red Sea. *J. Mar. Syst.* 60, 220-234. doi: 10.1016/j.jmarsys.2005.09.007.
- Hermabessiere, L., Paul-pont, I., Cassone, A., Himber, C., Receveur, J., Jezequel, R., et al. (2019). Microplastic contamination and pollutant levels in mussels and cockles collected along the channel coasts \*. *Environ. Pollut.* 250, 807-819. doi: 10.1016/j.envpol.2019.04.051.
- Hilbish, T. J., Brannock, P. M., Jones, K. R., Smith, A. B., Bullock, B. N., y Wethey, D. S. (2010). Historical changes in the distributions of invasive and endemic marine invertebrates are contrary to global warming predictions: The effects of decadal climate oscillations. *J. Biogeogr.* 37, 423-431. doi: 10.1111/j.1365-2699.2009.02218.x.
- His, E., Robert, R., y Dinet, A. (1989). Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 100, 455-463. doi: 10.1007/BF00394822.
- Hummel, H., Bogaards, R. H., Nieuwenhuize, J., De Wolf, L., y Van Liere, J. M. (1990). Spatial and seasonal differences in the PCB content of the mussel *Mytilus edulis*. *Sci. Total Environ.* 92, 155-163.
- Hylland, K. (2012). «Background document: metallothionein (MT) in blue mussels (*Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*)», en *Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. ICES Cooperative research report n° 315*, 107-110.
- INDEC (2010). Instituto Nacional de Estadísticas y Censos República Argentina. URL <https://www.indec.gob.ar>.
- Intergovernmental Oceanographic Commission (2011). A Blueprint for Ocean and Coastal Sustainability. An inter-agency paper towards the preparation of the UN Conference on Sustainable Development (Rio-20), Paris: IOC/UNESCO. 42.
- Iriarte, A., Aravena, G., Villate, F., Uriarte, I., Ibáñez, B., Llope, M., et al. (2010). Dissolved oxygen in contrasting estuaries of the Bay of Biscay: Effects of temperature, river discharge and chlorophyll a. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 418, 57-71. doi: 10.3354/meps08812.
- Iriarte, A., Villate, F., Uriarte, I., y Arranz, S. (2016). Assessment of the climate and human impact on estuarine water environments in two estuaries of the Bay of Biscay. *Oceanol. Hydrobiol. Stud.* 45,

505-523. doi: 10.1515/ohs-2016-0043.

- Isla, F. I., Guzzi, J. P., Zamora, Á., y Folabella, A. (1998). Aportes de coliformes a la costa de Mar del Plata (Argentina) por vías naturales e inducidas. *Thalass. An Int. J. Mar. Sci.* 14, 63-70.
- Isla, A. F. I., Bujalesky, G. G., Bértola, G. R., Iantanos, N., Estrada, E., Estrada, E., et al. (2006). Typology of Argentine Beaches: Composition, Tidal Range and Wave Energy. *J. Coast. Res.* 1, 375-378.
- Islam, M. S., y 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. doi: 10.1016/j.marpolbul.2003.12.004.
- Izagirre, U., Garmendia, L., Soto, M., Etxebarría, N., y Marigómez, I. (2014). Health status assessment through an integrative biomarker approach in mussels of different ages with a different history of exposure to the Prestige oil spill. *Sci. Total Environ.* 493, 65-78. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.118.
- Jimeno-Romero, A., Bilbao, E., Izagirre, U., Cajaraville, M. P., Marigómez, I., y Soto, M. (2017). Digestive cell lysosomes as main targets for Ag accumulation and toxicity in marine mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to maltose-stabilised Ag nanoparticles of different sizes. *Nanotoxicology* 11, 168-183. doi: 10.1080/17435390.2017.1279358.
- JPI-Oceans (2021). *Policy paper knowledge hub on the integrated assessment of chemical contaminants and their effects on the marine environment*. Brussels.
- Kagley, A. N., Snider, R. G., Krishnakumar, P. K., y Casillas, E. (2003). Assessment of seasonal variability of cytochemical responses to contaminant exposure in the blue mussel *Mytilus edulis* (Complex ). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 43-52. doi: 10.1007/s00244-002-1303-3.
- Kamel, N., Jebali, J., Banni, M., Ben Khedher, S., Chouba, L., y Boussetta, H. (2012). Biochemical responses and metals levels in *Ruditapes decussatus* after exposure to treated municipal effluents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 82, 40-46. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.05.008.
- Katsumiti, A., Gilliland, D., Arostegui, I., y Cajaraville, M. P. (2015). Mechanisms of toxicity of Ag nanoparticles in comparison to bulk and ionic Ag on mussel hemocytes and gill cells. *PLoS One* 10, 1-30. doi: 10.1371/journal.pone.0129039.
- Kim, Y., Ashton-Alcox, K. ., y Powell, E. N. (2006). «Histological techniques for marine bivalve molluscs: update», en *NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25*, 97.
- Kimbrough, K. L., Johnson, W. E., Lauenstein, G. G., Christensen, J. D., y Apeti, D. A. (2008). An assessment of two decades of contaminant monitoring in the Nations's Coastal Zone. Silver Spring, MD. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 74. 105.
- Kolandhasamy, P., Su, L., Li, J., Qu, X., Jabeen, K., y Shi, H. (2018). Adherence of microplastics to soft tissue of mussels: A novel way to uptake microplastics beyond ingestion ☆. *Sci. Total Environ.* 610-611, 635-640. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.053.
- Koukouzika, N., Raftopoulou, E. K., y Dimitriadis, V. K. (2009). Seasonal differences of lysosomal, lipid and lipofuscin parameters in the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Molluscan Stud.* 75, 261-267. doi: 10.1093/mollus/eyp022.
- Laitano, M. V., Castro, Í. B., Costa, P. G., Fillmann, G., y Cledón, M. (2015). Butyltin and PAH contamination of Mar del Plata Port (Argentina) sediments and their influence on adjacent coastal regions. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 95, 513-520. doi: 10.1007/s00128-015-1637-y.

- Laitano, M. V., y Fernández-Gimenez, A. V. (2016). Are mussels always the best bioindicators? Comparative study on biochemical responses of three marine invertebrate species to chronic port pollution. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97, 50-55. doi: 10.1007/s00128-016-1839-y.
- Laitano, M. V., Silva Barni, M. F., Costa, P. G., Cledón, M., Fillmann, G., Miglioranza, K. S. B., et al. (2016). Different carbon sources affect PCB accumulation by marine bivalves. *Mar. Environ. Res.* 113, 62-69. doi: 10.1016/j.marenvres.2015.11.004.
- Langton, R. W. (1975). Synchrony in the digestive diverticula of *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 55, 221-229.
- Lee, S., y Morton, B. (1985). The introduction of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* into Hong Kong. *Malacol. Rev.* 18, 107-109.
- Lekube, X., Izagirre, U., Soto, M., y Marigómez, I. (2014). Lysosomal and tissue-level biomarkers in mussels cross-transplanted among four estuaries with different pollution levels. *Sci. Total Environ.* 472, 36-48. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.10.075.
- Li, J., Yang, D., Li, L., Jabeen, K., y Shi, H. (2015). Microplastics in commercial bivalves from China. *Environ. Pollut.* 207, 190-195. doi: 10.1016/j.envpol.2015.09.018.
- Li, J., Lusher, A. L., Rotchell, J. M., Deudero, S., Turra, A., Lise, I., et al. (2019). Using mussel as a global bioindicator of coastal microplastic pollution. *Environ. Pollut.* 244, 522-533. doi: 10.1016/j.envpol.2018.10.032.
- Lins, D. M., Zbawicka, M., Wenne, R., Poćwierz-Kotus, A., Molina, J. R. A., Alves, L. P., et al. (2021). Ecology and genetics of *Mytilus galloprovincialis*: A threat to bivalve aquaculture in southern Brazil. *Aquaculture* 540. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736753.
- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Livingstone, D. R. (1993). Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 57, 195-211. doi: 10.1002/jctb.280570302.
- Llanos, E. N., Andrea, M., Bottero, S., Jaubet, M. L., Garaffo, V., Hines, E., et al. (2021). The boom-bust dynamic of the invader *Boccardia proboscidea* mediated by sewage discharge: The response of the intertidal epilithic community in the Southwest Atlantic. *Mar. Pollut. Bull.* 164, 112045. doi: 10.1016/j.marpolbul.2021.112045.
- Lohmann, R., y Belkin, I. M. (2014). Organic pollutants and ocean fronts across the Atlantic Ocean: A review. *Prog. Oceanogr.* 128, 172-184. doi: 10.1016/j.pocean.2014.08.013.
- Long, E. R., Macdonald, D. D., Smith, S. L., y Calder, F. D. (1995). Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ. Manage.* 19, 81-97. doi: 10.1007/BF02472006.
- Long, E. R., Ingersoll, C. G., y MacDonald, D. D. (2006). Calculation and uses of mean Sediment Quality Guideline Quotients: A critical review. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1726-1736.
- Lopes, B., Ferreira, A. M., y Bebianno, M. J. (2012). Responses of CYP450 dependent system to aliphatic and aromatic hydrocarbons body burden in transplanted mussels from South coast of Portugal. *Ecotoxicology* 21, 730-749. doi: 10.1007/s10646-011-0834-7.
- López Gappa, J. J., Tablado, A., y Magaldi, N. H. (1990). Influence of sewage pollution on a rocky intertidal community dominated by the mytilid *Brachidontes rodriguezi*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 63, 163-175.

- Lowe, D. M., Moore, M. N., y Clarke, K. R. (1981). Effects of oil on digestive cells in mussels: Quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquat. Toxicol.* 1, 213-226. doi: 10.1016/0166-445X(81)90016-3.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., y De Poorter, M. (2004). 100 de las Especies Exóticas Invasoras más dañinas del mundo. Una selección del Global Invasive Species Database. Publicado por el Grupo de Especies Invasoras (GEEI), un grupo especialista de la Comisión de Supervivencia de Especies (CSE) de la Unión Mund. *Aliens*, 12pp.
- Lozoya, J. P., Teixeira de Mello, F., Carrizo, D., Weinstein, F., Olivera, Y., Cedrés, F., et al. (2016). Plastics and microplastics on recreational beaches in Punta del Este (Uruguay): Unseen critical residents? \*. *Environ. Pollut.* 218, 931-941. doi: 10.1016/j.envpol.2016.08.041.
- Lucas, A. J., Guerrero, R. A., Mianza, H. W., Acha, E. M., y Lasta, C. A. (2005). Coastal oceanographic regimes of the Northern Argentine Continental Shelf ( 34-43S )\*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 65, 405-420. doi: 10.1016/j.ecss.2005.06.015.
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13-30. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.10.006.
- Lusher, A. (2015). «Microplastics in the Marine Environment: Distribution, interactions and effects», en *Marine anthropogenic litter*, eds. M. Bergmann, L. Gutow, y M. Klages, 245-307. doi: 10.1007/978-3-319-16510-3.
- Lyons, B. P., Thain, J. E., Stentiford, G. D., Hylland, K., Davies, I. M., y Vethaak, A. D. (2010). Using biological effects tools to define Good Environmental Status under the European Union Marine Strategy Framework Directive. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1647-1651. doi: 10.1016/j.marpolbul.2010.06.005.
- Lyons, B., Hylland, K., Martínez-Gómez, C., y Sanni, S. (2012). «Background document: comet assay as a method for assessing DNA damage in aquatic organisms», en *Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. ICES Cooperative research report n° 315*, 54-59.
- Maioli, O. L. G., Rodrigues, K. C., Knoppers, B. A., y Azevedo, D. A. (2010). Polycyclic aromatic and aliphatic hydrocarbons in *Mytella charruana*, a bivalve mollusk from Mundaú Lagoon, Brazil. *Microchem. J.* 96, 172-179. doi: 10.1016/j.microc.2010.03.001.
- Marigómez, I., y Baybay-Villacorta, L. (2003). Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. *Aquat. Toxicol.* 64, 235-257. doi: 10.1016/S0166-445X(03)00056-0.
- Marigómez, I., Orbea, A., Olabarrieta, I., Etxeberria, M., y Cajaraville, M. P. (1996). Structural changes in the digestive lysosomal system of sentinel mussels as biomarkers of environmental stress in mussel-watch programmes. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 113, 291-297. doi: 10.1016/0742-8413(95)02100-0.
- Marigómez, I., Cajaraville, M. P., Soto, M., y Lekube, X. (1998). Cell-type replacement, a succesful strategy of mollusks to adapt to chronic exposure to pollutants. *Cuad. Investig. Biológica* 20, 411-414.
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M. P., Angulo, E., y Giamberini, L. (2002). Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 56, 358-392. doi: 10.1002/jemt.10040.
- Marigómez, I., Soto, M., Orbea, A., Cancio, I., y Cajaraville, M. P. (2004). «Biomonitoring of

- environmental pollution along the Basque coast, using molecular, cellular and tissue-level biomarkers: an integrative approach», en *Oceanography and marine environment of the Basque Country*, eds. A. Borja y M. Collins, 335-364. doi: 10.1016/S0422-9894(04)80052-7.
- Marigómez, I., Lekube, X., Cajaraville, M. P., Domouhtsidou, G., y Dimitriadis, V. (2005). Comparison of cytochemical procedures to estimate lysosomal biomarkers in mussel digestive cells. *Aquat. Toxicol.* 75, 86-95. doi: 10.1016/j.aquatox.2005.07.002.
- Marigómez, I., Soto, M., Cancio, I., Orbea, A., Garmendia, L., y Cajaraville, M. P. (2006). Cell and tissue biomarkers in mussel, and histopathology in hake and anchovy from Bay of Biscay after the Prestige oil spill (Monitoring Campaign 2003). *Mar. Pollut. Bull.* 53, 287-304. doi: 10.1016/j.marpolbul.2005.09.026.
- Marigómez, I., Garmendia, L., Soto, M., Orbea, A., Izagirre, U., y Cajaraville, M. P. (2013a). Marine ecosystem health status assessment through integrative biomarker indices: A comparative study after the Prestige oil spill «mussel Watch». *Ecotoxicology* 22, 486-505. doi: 10.1007/s10646-013-1042-4.
- Marigómez, I., Zorita, I., Izagirre, U., Ortiz-zarragoitia, M., Navarro, P., Etxebarria, N., et al. (2013b). Combined use of native and caged mussels to assess biological effects of pollution through the integrative biomarker approach. *Aquat. Toxicol.* 136-137.
- Marigómez, I., Múgica, M., Izagirre, U., y Sokolova, I. M. (2017). Chronic environmental stress enhances tolerance to seasonal gradual warming in marine mussels. *PLoS One* 12, e0174359. doi: 10.1371/journal.pone.0174359.
- Markert, B. A., Breure, A. M., y Zechmeister, H. G. (2003). Chapter 1 Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. *Trace Met. other Contam. Environ.* 6, 3-39. doi: 10.1016/S0927-5215(03)80131-5.
- Marklund, S., y Marklund, G. (1974). Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469-474. doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x.
- Márquez, F., Adami, M. L., Trovant, B., Nieto-Vilela, R. A., y González-José, R. (2018). Allometric differences on the shell shape of two scorched mussel species along the Atlantic South American Coast. *Evol. Ecol.* 32, 43-56. doi: 10.1007/s10682-018-9928-5.
- Martínez-Gómez, C., y Thain, J. (2012). «Background document: stress on stress (SoS) in bivalve molluscs», en *Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. ICES Cooperative Research Report n° 315*, 121-123.
- Martínez-Gómez, C., Robinson, C. D., Burgeot, T., Gubbins, M., Halldorsson, H. P., Albentosa, M., et al. (2017). Biomarkers of general stress in mussels as common indicators for marine biomonitoring programmes in Europe: The ICON experience. *Mar. Environ. Res.* 124, 70-80. doi: 10.1016/j.marenvres.2015.10.012.
- Massara Paletto, V., Commendatore, M. G., y Esteves, J. L. (2008). Hydrocarbon levels in sediments and bivalve mollusks from Bahía Nueva (Patagonia, Argentina): An assessment of probable origin and bioaccumulation factors. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 2082-2105.
- Mathers, N. F., Smith, T., y Collins, N. (1979). Monophasic and diphasic digestive cycles in *Venerupis decussata* and *Chlamys varia*. *J. Molluscan Stud.* 45, 68-81.
- McCarthy, J. F., y Shugart, L. R. (1990). *Biomarkers of environmental contamination*. doi:

10.1201/9781351070263.

- McCarty, L. S., y Munkittrick, K. R. (1996). Environmental biomarkers in aquatic toxicology: Fiction, fantasy, or functional? *Hum. Ecol. Risk Assess.* 2, 268-274. doi: 10.1080/10807039609383607.
- McDonald, J. H., y Koehn, R. K. (1988). The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the Pacific coast of North America. *Mar. Biol.* 99, 111-118. doi: 10.1007/BF00644984.
- McDonald, J. H., Seed, R., y Koehn, R. K. (1991). Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the Northern and Southern Hemispheres. *Mar. Biol.* 111, 323-333. doi: 10.1007/BF01319403.
- Mearns, A. J., Bissell, M., Morrison, A. M., Rempel-Hester, M. A., Arthur, C., y Rutherford, N. (2019). *Effects of pollution on marine organisms*. doi: 10.1002/wer.1218.
- Mendoza, A., Osa, J. L., Basurko, O. C., Rubio, A., Santos, M., Gago, J., et al. (2020). Microplastics in the Bay of Biscay: An overview. *Mar. Pollut. Bull.* 153, 110996. doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.110996.
- Miglioranza, K. S. B., Becherucci, M. E., de Marco, S. G., Pérsico, M. M., Bazterrica, M. C., Gavio, M. A., ... & Seco Pon, J. P. (2021). *Informes de revisión. Área: Disponibilidad y contaminación del agua, suelos y aire: Contaminación de costas, 145 pp. REAB-MDP.*, ed. K. Miglioranza.
- Miglioranza, K. S. B., Aizpún De Moreno, J. E., y Moreno, V. J. (2004). Land-based sources of marine pollution: Organochlorine pesticides in stream systems. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 11, 227-232. doi: 10.1007/BF02979630.
- Montserrat, J. M. (2021). «Estrés oxidativo», en *Principios de Ecotoxicología*, 116-125.
- Moore, M. N. (1988). Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46, 81-89.
- Moschino, V., Del, P., Vittor, C. De, y Da, L. (2016). Biomonitoring of a polluted coastal area (Bay of Muggia, Northern Adriatic Sea): A five-year study using transplanted mussels. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 128, 1-10. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.02.006.
- Muniz, P., Danulat, E., Yannicelli, B., García-Alonso, J., Medina, G., y Bicego, M. C. (2004). Assessment of contamination by heavy metals and petroleum hydrocarbons in sediments of Montevideo Harbour (Uruguay). *Environ. Int.* 29, 1019-1028. doi: 10.1016/S0160-4120(03)00096-5.
- Muniz, P., Lana, P., Venturini, N., Elias, R., Vallarino, E., Bremec, C., et al. (2013). *Un manual de protocolos para evaluar la contaminación marina por efluentes domésticos*.
- Murphy, F., Ewins, C., Carbonnier, F., y Quinn, B. (2016). Wastewater treatment works (WwTW) as a source of microplastics in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5800-5808. doi: 10.1021/acs.est.5b05416.
- Murray, F., y Cowie, R. P. (2011). Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1207-1217. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.03.032.
- Napper, I. E., y Thompson, R. C. (2016). Release of synthetic microplastic plastic fibres from domestic washing machines: Effects of fabric type and washing conditions. *Mar. Pollut. Bull.* 112, 39-45. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.09.025.
- Navarro, A., Faria, M., Barata, C., y Piña, B. (2011). Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environ. Pollut.* 159, 100-107. doi:

10.1016/j.envpol.2010.09.018.

- Nice, H. E. (2005). Sperm motility in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) is affected by nonylphenol. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1668-1674. doi: 10.1016/j.marpolbul.2005.07.006.
- Nice, H. E., Morritt, D., Crane, M., y Thorndyke, M. (2003). Long-term and transgenerational effects of nonylphenol exposure at a key stage in the development of *Crassostrea gigas*. Possible endocrine disruption? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 256, 293-300.
- Núñez, J. D., Laitano, M. V., y Cledón, M. (2012). An intertidal limpet species as a bioindicator: Pollution effects reflected by shell characteristics. *Ecol. Indic.* 14, 178-183. doi: 10.1016/j.ecolind.2011.07.015.
- Oehlmann, J., y Schulte-Oehlmann, U. (2003). Molluscs as bioindicators. *Trace Met. other Contam. Environ.*, 577-635. doi: 10.1016/S0927-5215(03)80147-9.
- Ojeda, M., Torroglosa, M. E., Cremonte, F., Yuvero, C., y Giménez, J. (2021). Pathological conditions of the sentinel bivalve, the little mussel *Brachidontes rodriguezii*, from contaminated intertidal sites in the Southwestern Atlantic coast. *J. Invertebr. Pathol.* 184. doi: 10.1016/j.jip.2021.107654.
- Oliva, A. L., Ovaert, J., Arias, A. H., Souissi, S., y Marcovecchio, J. E. (2015). Mussels as bioindicators of PAHs pollution within argentinean coastal environments, South America. *Int. J. Environ. Res.* 9, 1293-1304.
- Oliva, A. L., Arias, A. H., Quintas, P. Y., Buzzi, N. S., y Marcovecchio, J. E. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons in mussels from a South American Estuary. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 540-551. doi: 10.1007/s00244-017-0392-y.
- Orbea, A., y Cajaraville, M. P. (2006). Peroxisom Proliferation and antioxidant enzymes in transplanted mussels of four Basque Estuaries with different levels of polycyclic aromatic hydrocarbon and polychlorinated biphenyl pollution. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1616-1626.
- Orbea, A., Marigómez, I., Fernández, C., Tarazona, J. V., Cancio, I., y Cajaraville, M. P. (1999). Structure of peroxisomes and activity of the marker enzyme catalase in digestive epithelial cells in relation to PAH content of mussels from two Basque Estuaries (Bay of Biscay): Seasonal and site-specific variations. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 166, 158-166.
- Orbea, A., Ortiz-zarragoitia, M., Solé, M., Porte, C., y Cajaraville, M. P. (2002). Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquat. Toxicol.* 58, 75-98.
- Orbea, A., Garmendia, L., Marigómez, I., y Cajaraville, M. P. (2006). Effects of the «Prestige» oil spill on cellular biomarkers in intertidal mussels: Results of the first year of studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 306, 177-189. doi: 10.3354/meps306177.
- Ortiz-zarragoitia, M., y Cajaraville, M. P. (2010). Intersex and oocyte atresia in a mussel population from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 693-701. doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.04.002.
- Ortiz-Zarragoitia, M., y Cajaraville, M. P. (2006). Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disrupters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 361-369. doi: 10.1007/s00244-005-1082-8.
- Ortiz-Zarragoitia, M., Garmendia, L., Barbero, M. C., Serrano, T., Marigómez, I., y Cajaraville, M. P. (2011). Effects of the fuel oil spilled by the Prestige tanker on reproduction parameters of wild

- mussel populations. *J. Environ. Monit.* 13, 84-94. doi: 10.1039/c0em00102c.
- OSSE (2020). Obras Sanitarias S. E. MGP. URL <https://www.osmgp.gov.ar/osse/>.
- Pampanin, D. M., Volpato, E., Marangon, I., y Nasci, C. (2005). Physiological measurements from native and transplanted mussel *Mytilus galloprovincialis* in the canals of Venice. Survival in air and condition index. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 140, 41-52. doi: 10.1016/j.cbpb.2004.10.016.
- Paul-Pont, I., Lacroix, C., González Fernández, C., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goïc, N., et al. (2016). Exposure of marine mussels *Mytilus* spp. to polystyrene microplastics: Toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. *Environ. Pollut.* 216, 724-737. doi: 10.1016/j.envpol.2016.06.039.
- Penchaszadeh, P. E. (1973). Ecología de la Comunidad del Mejillín (*B. rodriguezii*) en el medio litotal rocoso de mar del plata: El proceso de recolonización. *Physis* 32, 51-64.
- Penchaszadeh, P. E., Scelzo, M. A., Palomo, G., Cuevas, M., y Cledón, M. (2007). A review of the intertidal rocky shore community at Mar del Plata (Argentina) characterized by the mussel *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846). *Publ. Seto Mar. Biol. Lab* 8, 115-123. Available at: [http://www.macn.secyt.gov.ar/investigacion/descargas/ecologia/articulos/penchaszadeh/2007\\_penchaszadeh\\_et\\_al.pdf](http://www.macn.secyt.gov.ar/investigacion/descargas/ecologia/articulos/penchaszadeh/2007_penchaszadeh_et_al.pdf).
- Pérez, A. F., Ojeda, M., Rimondino, G. N., Chiesa, I. L., Di Mauro, R., Boy, C. C., et al. (2020). First report of microplastics presence in the mussel *Mytilus chilensis* from Ushuahia Bay (Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina). *Mar. Pollut. Bull.* 161, 111753.
- Petrović, S., Semencić, L., Ozretić, B., y Ozretić, M. (2004). Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of North Adriatic coastal waters (Croatia). *Mar. Pollut. Bull.* 49, 713-720. doi: 10.1016/j.marpolbul.2004.05.004.
- Ponder, W. F., Lindberg, D. R., y Ponder, J. M. (2020). *Biology and Evolution of the Mollusca*. Vol. 1-2. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Ratón.
- Prieto, A., Zuloaga, O., Usobiaga, A., Bartolomé, L., Fernández, L. A., Etxebarria, N., et al. (2008). Levels and spatial distribution of inorganic and organic contaminants in sediments along the Bilbao estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 2094-2099. doi: 10.1016/j.marpolbul.2008.08.027.
- Puy-Azurmendi, E., Ortiz-Zarragoitia, M., Villagrasa, M., Kuster, M., Aragón, P., Atienza, J., et al. (2013). Endocrine disruption in thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*) from the Urdaibai Biosphere Reserve (Bay of Biscay, Southwestern Europe). *Sci. Total Environ.* 443, 233-244. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.10.078.
- Qu, X., Su, L., Li, H., Liang, M., y Shi, H. (2018). Assessing the relationship between the abundance and properties of microplastics in water and in mussels. *Sci. Total Environ.* 621, 679-686. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.284.
- Quintas, P. Y., Arias, A. H., Oliva, A. L., Domini, C. E., Alvarez, M. B., Garrido, M., et al. (2017). Organotin compounds in *Brachidontes rodriguezii* mussels from the Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 145, 518-527. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.07.052.
- Raftopoulou, E. K., y Dimitriadis, V. K. (2012). Aspects of the digestive gland cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*, in relation to lysosomal enzymes, lipofuscin presence and shell size: Contribution in the assessment of marine pollution biomarkers. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 182-188. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.12.017.
- Raftopoulou, E. K., Domouhtsidou, G. P., y Dimitriadis, V. K. (2003). Autometallographic localization of heavy metals in resin sections, cryosections and isolated cells of the mussel *Mytilus*

- galloprovincialis* (L.). *Histochem. J.* 34, 583-588. doi: 10.1023/A:1026032714331.
- Raisuddin, S., y Jha, A. N. (2004). Relative sensitivity of fish and mammalian cells to sodium arsenate and arsenite as determined by alkaline single-cell gel electrophoresis and cytokinesis-block micronucleus assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 44, 83-89. doi: 10.1002/em.20027.
- Ramdine, G., Fichet, D., Louis, M., y Lemoine, S. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediment and oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from mangrove of Guadeloupe: Levels, bioavailability, and effects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 79, 80-89. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.12.005.
- Regoli, F. (1992). Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 84, 63-69.
- Regoli, F. (2000). Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: A predictive biomarker of oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 50, 351-361.
- Reguera, P., Viñas, L., y Gago, J. (2019). Microplastics in wild mussels (*Mytilus* spp.) from the north coast of Spain. *Sci. Mar.* 83, 337-347.
- Rezania, S., Park, J., Md Din, M. F., Mat Taib, S., Talaiekhosani, A., Kumar Yadav, K., et al. (2018). Microplastics pollution in different aquatic environments and biota: A review of recent studies. *Mar. Pollut. Bull.* 133, 191-208. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.05.022.
- Ríos, M. F., Hernández-Moresino, R. D., y Galván, D. E. (2020). Assessing urban microplastic pollution in a benthic habitat of Patagonia Argentina. *Mar. Pollut. Bull.* 159, 111491. doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111491.
- Rivero, M. S., Elías, R., y Vallarino, E. A. (2005). First survey of macroinfauna in the Mar del Plata Harbor (Argentina), and the use of polychaetes as pollution indicators. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 40, 101-108. doi: 10.4067/s0718-19572005000200002.
- Rocha, T. L., Bilbao, E., Cardoso, C., Soto, M., y Bebianno, M. J. (2018). Changes in metallothionein transcription levels in the mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to CdTe quantum dots. *Ecotoxicology* 27, 402-410. doi: 10.1007/s10646-018-1903-y.
- Rodríguez, J. G., Tueros, I., Borja, Á., Franco, J., Ignacio García Alonso, J., Garmendia, J. M., et al. (2009). Butyltin compounds, sterility and imposex assessment in *Nassarius reticulatus* (Linnaeus, 1758), prior to the 2008 European ban on TBT antifouling paints, within Basque ports and along coastal areas. *Cont. Shelf Res.* 29, 1165-1173. doi: 10.1016/j.csr.2009.01.005.
- Rodríguez, J. G., Solaun, O., Larreta, J., Belzunce Segarra, M. J., Franco, J., Ignacio García Alonso, J., et al. (2010). Baseline of butyltin pollution in coastal sediments within the Basque Country (northern Spain), in 2007-2008. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 139-145. doi: 10.1016/j.marpolbul.2009.11.003.
- Roose, P., Albaigés, J., Bebianno, M., Camphuysen, C., Cronin, M., de Leeuw, J., et al. (2011). Monitoring Chemical Pollution in Europe's Seas: Programmes, Practices and Priorities for Research, Marine Board Position Paper 16. *Calewaert, J.B. McDonough N. (Eds.). Mar. Board-ESF, Ostend, Belgium.*
- Rowland, S. J., y Volkman, J. K. (1982). Biogenic and pollutant aliphatic hydrocarbons in *Mytilus edulis* from the North Sea. *Mar. Environ. Res.* 7, 117-130.
- Ruiz, Y., Suarez, P., Alonso, A., Longo, E., Villaverde, A., y San Juan, F. (2011). Environmental quality of mussel farms in the Vigo estuary: Pollution by PAHs, origin and effects on reproduction. *Environ. Pollut.* 159, 250-265. doi: 10.1016/j.envpol.2010.08.031.

- Ruiz, M. D., Iriel, A., Yusseppone, M. S., Ortiz, N., Di Salvatore, P., Fernández Cirelli, A., et al. (2018). Trace metals and oxidative status in soft tissues of caged mussels (*Aulacomya atra*) on the North Patagonian coastline. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 155, 152-161. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.02.064.
- Sabatini, S. E., Noya Abad, T., Leis, M., Minaberry, Y. S., Yusseppone, M. S., Knack de Almeida, H., et al. (2023). Effects of metal accumulation on oxidative metabolism of *Mytilus edulis*, a commercially relevant mussel in northern Patagonia, Argentina. *Mar. Freshw. Res.* 74, 144-156. doi: 10.1071/mf22173.
- Saiz-Salinas, J. I. (1997). Evaluation of adverse biological effects induced by pollution in the Bilbao Estuary (Spain). *Environ. Pollut.* 96, 351-359. doi: 10.1016/S0269-7491(97)00042-0.
- Saracho Bottero, M. A., Jaubet, M. L., Llanos, E. N., Becherucci, M. E., Elías, R., y Garaffo, G. V. (2020). Spatial-temporal variations of a SW Atlantic macrobenthic community affected by a chronic anthropogenic disturbance. *Mar. Pollut. Bull.* 156, 111189. doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111189.
- Scagliola, M., y Furchi, P. (2006). Mar del Plata Public Works staff. Sewage outfall project of Mar del Plata city (Argentina): An effective intervention to achieve quality objectives on the marine environment. en *MWWD-IEMES. Antalya*, 22.
- Scelzo, M. A., Elias, R., Vallarino, E. A., Charrier, M., Lucero, N., y Alvarez, F. (1996). Variación estacional de la estructura comunitaria del bivalvo intermareal *Brachidontes rodriguezi* (d'Orbigny, 1846) en sustratos artificiales (Mar del Plata, Argentina). *Nerítica* 10, 87-102.
- Seed, R. (1969). The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lamellibranchiata) on exposed rocky shores - I. Breeding and settlement. *Oecologia* 3, 277-316. doi: 10.1007/BF00390380.
- Seed, R. (1992). Systematics evolution and distribution of mussels belonging to the genus *Mytilus*-an overview. *Am. Malacol. Bull.* 9, 123-137.
- SENASA (2000). Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Decreto 4238/68. Capítulo XXIII del Reglamento sanitario de explotación y comercialización de moluscos y bivalvos vivos para consumo humano directo. Inciso 23.24.2.5: Calidad Química (Res. SAGPYA N°53 del 30/09/98).
- Sendra, M., Sparaventi, E., Novoa, B., y Figueras, A. (2021). An overview of the internalization and effects of microplastics and nanoplastics as pollutants of emerging concern in bivalves. *Sci. Total Environ.* 753, 142024. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142024.
- Shimeta, J., y Jumars, P. A. (1991). Physical mechanisms and rates of particle capture by suspension-feeders. *Oceanogr. Mar. Biol.* 29, 191-257.
- Skarphéðinsdóttir, H., Ericson, G., Svavarsson, J., y Næs, K. (2007). DNA adducts and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) tissue levels in blue mussels (*Mytilus* spp.) from Nordic coastal sites. *Mar. Environ. Res.* 64, 479-491. doi: 10.1016/j.marenvres.2007.03.007.
- Small, G. M., Burdett, K., y Connock, M. J. (1985). A sensitive spectrophotometric assay for peroxisomal acyl-CoA oxidase. *Biochem. J.* 227, 205-210. doi: 10.1042/bj2270205.
- Smolarz, K., Hallmann, A., Zabrzeńska, S., y Pietrasik, A. (2017). Elevated gonadal atresia as biomarker of endocrine disruptors: Field and experimental studies using *Mytilus trossulus* (L.) and 17-alpha ethinylestradiol (EE2). *Mar. Pollut. Bull.* 120, 58-67. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.04.007.
- Solaun, O., Rodríguez, J. G., Borja, A., Franco, J., Larreta, J., y Valencia, V. (2013). Background metal levels determination in bivalves – quality assessment of the European Water Framework Directive. *Chem. Ecol.* 29, 11-27.

- Soria, S. A., Gutiérrez, J. L., Gonzalez, J. A., Callá, S. L., y Palomo, G. (2022). Estuarine , Coastal and Shelf Science Habitat properties and invertebrate composition in mussel-dominated rocky shores : A test of edge effects. 277. doi: 10.1016/j.ecss.2022.108035.
- Soriano, J. A., Viñas, L., Franco, M. A., González, J. J., Ortiz, L., Bayona, J. M., et al. (2006). Spatial and temporal trends of petroleum hydrocarbons in wild mussels from the Galician coast (NW Spain) affected by the Prestige oil spill. *Sci. Total Environ.* 370, 80-90. doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.06.012.
- Soto, M., Kortabitarte, M., y Marigómez, I. (1995). Bioavailable heavy metals in estuarine waters as assessed by metal/shell-weight indices in sentinel mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 125, 127-136. doi: 10.3354/meps125127.
- Soto, M., y Marigómez, I. (1997). Metal bioavailability assessment in «mussel-watch» programmes by automated image analysis of autometallographical black silver deposits (BSD) in digestive cell lysosomes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 156, 141-150.
- Sun, J., Dai, X., Wang, Q., van Loosdrecht, M. C. M., y Ni, B. (2019). Microplastics in wastewater treatment plants: Detection, occurrence and removal. *Water Res.* 152, 21-37. doi: 10.1016/j.watres.2018.12.050.
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M. E. J., et al. (2016). Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 2430-2435. doi: 10.1073/pnas.1519019113.
- Tang, N., Liu, X., y Xing, W. (2020). Microplastics in wastewater treatment plants of Wuhan, Central China: Abundance, removal, and potential source in household wastewater. *Sci. Total Environ.* 745, 141026. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141026.
- Thain, J. E., Vethaak, A. D., y Hylland, K. (2008). Contaminants in marine ecosystems: Developing an integrated indicator framework using biological-effect techniques. *ICES J. Mar. Sci.* 65, 1508-1514. doi: 10.1093/icesjms/fsn120.
- Timbrell, J. A., y Marrs, T. C. (2011). *Biotransformation of xenobiotics. General, Applied and Systems Toxicology*. doi: 10.1002/9780470744307.gat004.
- Tornero, V., y Hanke, G. (2016). Chemical contaminants entering the marine environment from sea-based sources: A review with a focus on European seas. *Mar. Pollut. Bull.* 112, 17-38. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.06.091.
- Toro, J. E., Ojeda, J. A., Vergara, A. M., Castro, G. C., y Alcapán, A. C. (2005). Molecular characterization of the Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis* Hupe 1854) demonstrates evidence for the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* in Southern Chile. *J. Shellfish Res.* 24, 1117-1121. doi: 10.2983/0730-8000(2005)24[1117:MCOTCB]2.0.CO;2.
- Torroglosa, M. E., y Giménez, J. (2016). Size at first maturity of *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846) from the South-western Atlantic Ocean. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 98, 457-462. doi: 10.1017/S0025315416001636.
- Torroglosa, M. E., y Giménez, J. (2019). Reproductive strategy of *Brachidontes rodriguezii* (Bivalvia: Mytiloida) in the South-western Atlantic Ocean. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 99, 155-162. doi: 10.1017/S0025315417001825.
- Trovant, B., Orensanz, J. M. L., Ruzzante, D. E., Stotz, W., y Basso, N. G. (2015). Molecular Phylogenetics and Evolution Scorched mussels ( BIVALVIA : MYTILIDAE : BRACHIDONTINAE )

- from the temperate coasts of South America: Phylogenetic relationships , trans-Pacific connections and the footprints of Quaternary glaciations. *Mol. Phylogenet. Evol.* doi: 10.1016/j.ympev.2014.10.002.
- Trovant, B., Basso, N. G., Orensanz, J. M., Lessa, E. P., Dincao, F., y Ruzzante, D. E. (2016). Scorched mussels (*Brachidontes* spp., Bivalvia: Mytilidae) from the tropical and warm-temperate southwestern Atlantic: Yhe role of the Amazon River in their speciation. *Ecol. Evol.* 6, 1778-1798. doi: 10.1002/ece3.2016.
- Truchet, D. M., López, A. D. F., Arduoso, M. G., Rimondino, G. N., Buzzi, N. S., Malanca, F. E., et al. (2021). Microplastics in bivalves, water and sediments from a touristic sandy beach of Argentina. *Mar. Pollut. Bull.* 173, 113023. doi: 10.1016/j.marpolbul.2021.113023.
- Tschanz, S. A., Burri, P. H., y Weibel, E. R. (2011). A simple tool for stereological assessment of digital images: The STEPanizer. *J. Microsc.* 243, 47-59. doi: 10.1111/j.1365-2818.2010.03481.x.
- UNEP. <https://www.unep.org/es>
- UNEP/RAMOGGE (1999). *Manual on the biomarkers recommended for the MED POL biomonitoring programme*. Athens.
- UNEP (2016). Marine plastic debris & microplastics - Global lessons and research to inspire action and guide policy change. *United Nations Environ. Program. Nairobi*.
- UNEP (2019). *Stockholm Convention on persistent organic pollutants (POPs)*. Geneve.
- Uriarte, I., y Villate, F. (2004). Effects of pollution on zooplankton abundance and distribution in two estuaries of the Basque coast (Bay of Biscay). *Mar. Pollut. Bull.* 49, 220-228. doi: 10.1016/j.marpolbul.2004.02.010.
- Vallarino, E. A., Rivero, M. S., Gravina, M. C., y Elías, R. (2002). The community-level response to sewage impact in intertidal mytilid beds of the Southwestern Atlantic, and the use of the Shannon index to assess pollution. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 37, 25-33.
- Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M. B., y Janssen, C. R. (2015). Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environ. Pollut.* 199, 10-17. doi: 10.1016/j.envpol.2015.01.008.
- Vandermeersch, G., Van Cauwenberghe, L., Janssen, C. R., Antonio, M., Granby, K., Fait, G., et al. (2015). A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms. *Environ. Res.* 143, 46-55. doi: 10.1016/j.envres.2015.07.016.
- Vasanthi, R. L., Arulvasu, C., Kumar, P., y Srinivasan, P. (2021). Ingestion of microplastics and its potential for causing structural alterations and oxidative stress in Indian green mussel *Perna viridis* – A multiple biomarker approach. *Chemosphere* 283, 130979. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.130979.
- Vázquez, N., y Cremonte, F. (2017). Review of parasites and pathologies of the main bivalve species of commercial interest of Argentina and Uruguay, Southwestern Atlantic Coast. *Arch. Parasitol.* 1, 1-12.
- Vázquez, N., Ituarte, C., y Cremonte, F. (2015). A histopathological study of the geoduck clam *Panopea abbreviata* from San José Gulf, North Patagonia, Argentina. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 95, 1173-1181. doi: 10.1017/S0025315415000144.
- Vázquez, N., Frizzera, A., y Cremonte, F. (2020). Diseases and parasites of wild and cultivated mussels along the Patagonian coast of Argentina, southwest Atlantic Ocean. *Dis. Aquat. Organ.* 139, 139-

- Vega, M. M., Marigómez, J. A., y Angulo, E. (1989). Quantitative alterations in the structure of the digestive cell of *Littorina littorea* on exposure to cadmium. *Mar. Biol.* 103, 547-553. doi: 10.1007/BF00399587.
- Vethaak, A. D., Davies, I. M., Thain, J. E., Gubbins, M. J., Martínez-Gómez, C., Robinson, C. D., et al. (2017). Integrated indicator framework and methodology for monitoring and assessment of hazardous substances and their effects in the marine environment. *Mar. Environ. Res.* 124, 11-20. doi: 10.1016/j.marenvres.2015.09.010.
- Viarengo, A., y Nott, J. A. (1993). Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 104, 355-372.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M. N., y Orunesu, M. (1990). Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp.* 97, 37-42. doi: 10.1016/0742-8413(90)90168-9.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., y Livingstone, D. R. (1991). Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 187-190.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Mancinelli, G., Accomando, R., Smaal, A. C., et al. (1995). Stress on stress response: A simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. *Mar. Environ. Res.* 39, 245-248. doi: 10.1016/0141-1136(94)00075-Z.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., y 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 Toxicol. Pharmacol.* 146, 281-300. doi: 10.1016/j.cbpc.2007.04.011.
- Villalva, A. (1995). Gametogenic cycle of cultured mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in the bays of Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture* 130, 269-277.
- Villate, F., Franco, J., Ruiz, A., y Orive, E. (1989). Caracterización Geomorfológica e Hidrológica De Cinco Sistemas Estuáricos Del País Vasco. *Kobie* 18, 157-170.
- Vivekanand, A. C., Mohapatra, S., y Tyagi, V. K. (2021). Microplastics in aquatic environment: Challenges and perspectives. *Chemosphere* 282, 131151. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.131151.
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., y Scoullos, M. J. (2007). Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1361-1371. doi: 10.1016/j.marpolbul.2007.05.018.
- Volkman, J. K., Holdsworth, D. G., Neill, G. P., y Bavor Jr, H. J. (1992). Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. *Sci. Total Environ.* 112, 203-219.
- von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., y Koehler, A. (2012). Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11327-11335. doi: 10.1021/es302332w.
- Wang, C., y Croll, R. P. (2004). Effects of sex steroids on gonadal development and gender determination in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture* 238, 483-498. doi:

- 10.1016/j.aquaculture.2004.05.024.
- Wang, C., Zhao, J., y Xing, B. (2021). *Environmental source, fate, and toxicity of microplastics*. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124357.
- Weibel, E. R. (1979). *Stereological Methods, vol. 1*. London: Academic Press.
- Widdows, J., y Donkin, P. (1992). «Mussels and environmental contaminants: Bioaccumulation and physiological aspects», en Gosling E, ed. *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics, and Culture*, 414-514.
- Wilkins, N. P., Fujino, K., y Gosling, E. M. (1983). The mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in Japan. *Biol. J. Linn. Soc.* 20, 365-374. doi: 10.1111/j.1095-8312.1983.tb01597.x.
- Wright, S. L., Thompson, R. C., y Galloway, T. S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environ. Pollut.* 178, 483-492. doi: 10.1016/j.envpol.2013.02.031.
- Xie, J., Zhao, Y., Wang, Q., Wu, H., Teng, J., Yang, D., et al. (2016). An integrative biomarker approach to assess the environmental stress in the north coast of Shandong Peninsula using native oysters, *Crassostrea gigas*. *Mar. Pollut. Bull.* 112, 318-326. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.07.049.
- Xiu, M., Pan, L., Jin, Q., y Miao, J. (2015). Gender differences in detoxification metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 170, 50-59. doi: 10.1016/j.cbpc.2015.02.003.
- Xu, K. Y., y Kuppusamy, P. (2005). Dual effects of copper–zinc superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 1190-1193. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.249.
- Xu, S., Ma, J., Ji, R., Pan, K., y Miao, A. (2020). Microplastics in aquatic environments: occurrence, accumulation, and biological effects. *Sci. Total Environ.* 703, 134699. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134699.
- Yonge, C. M. (1926). XV.—The Digestive Diverticula in the Lamellibranchs. *Trans. R. Soc. Edinburgh* 54, 703-718. doi: 10.1017/S0080456800016124.
- Yunker, M. B., Macdonald, R. W., Vingarzan, R., Mitchell, H. R., Goyette, D., y Sylvestre, S. (2002). PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Org. Geochem.* 33, 489-515.
- Zaldibar, B., Cancio, I., y Marigómez, I. (2007a). Reversible alterations in epithelial cell turnover in digestive gland of winkles (*Littorina littorea*) exposed to cadmium and their implications for biomarker measurements. *Aquat. Toxicol.* 81, 183-196. doi: 10.1016/j.aquatox.2006.12.007.
- Zaldibar, B., Cancio, I., Soto, M., y Marigómez, I. (2007b). Digestive cell turnover in digestive gland epithelium of slugs experimentally exposed to a mixture of cadmium and kerosene. *Chemosphere* 70, 144-154. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.06.071.
- Zbawicka, M., Trucco, M. I., y Wenne, R. (2018). Single nucleotide polymorphisms in native South American Atlantic coast populations of smooth shelled mussels: Hybridization with invasive European *Mytilus galloprovincialis*. *Genet. Sel. Evol.* 50, 1-14. doi: 10.1186/s12711-018-0376-z.
- Zorita, I., Apraiz, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Orbea, A., Cancio, I., Soto, M., et al. (2007a). Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using mussels as sentinel organisms. *Environ. Pollut.* 148, 236-250. doi: 10.1016/j.envpol.2006.10.022.
- Zorita, I., Bilbao, E., Schad, A., Cancio, I., Soto, M., y Cajaraville, M. P. (2007b). Tissue- and cell-specific expression of metallothionein genes in cadmium- and copper-exposed mussels analyzed by *in situ* hybridization and RT-PCR. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220, 186-196. doi:

10.1016/j.taap.2007.01.003.

## ANEXO: Protocolos de laboratorio

En este anexo se detallan todos los protocolos de laboratorio mencionados en la presente tesis.

### Abundancia de microplásticos en masa visceral

Basado en: Bessa, F., Frias, J., Kögel, T., Lusher, A., Andrade, J. M., Antunes, J., et al. (2019).

Harmonized protocol for monitoring microplastics in biota. JPI-Oceans BASEMAN project.

#### 1. Materiales

- Placas de Petri de vidrio
- Vasos de precipitados de vidrio o viales
- Pinzas, agujas metálicas, bisturí, material de disección
- Filtros reticulados de nitrato de celulosa de 1,2  $\mu\text{m}$  (Microclar®)
- Filtros de fibra de vidrio

#### 2. Equipo

- Incubadora con baño térmico para digestión (opcional si la digestión no se realiza a temperatura ambiente)
- Kit de filtración con bomba de vacío
- Estereomicroscopio

#### 3. Reactivos y soluciones

- Solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10 % (p/v) (CAS 1310-58-3) para la digestión
- Agua destilada filtrada con filtros de fibra de vidrio

#### 4. Consideraciones y precauciones

- Lavar todo el material de vidrio utilizado con agua destilada filtrada (o agua ultrapura)
- El KOH debe ser filtrado.
- Realizar todo el procesado de muestras en un ambiente libre de corrientes de aire.
- Usar una bata de laboratorio 100% algodón todo el tiempo y registrar el color de la ropa utilizada debajo de la bata de laboratorio.
- Evitar el uso de instrumentos de laboratorio de plástico: utilizar guantes de nitrilo, cristalería y espátula de metal.
- Cubrir las muestras con papel de aluminio durante la digestión y filtración.

#### 5. Blancos y controles de procedimiento

Los blancos del procedimiento de digestión (como control negativo) deben incluirse en cada lote (típicamente 3 blancos por lote). Se realizan sin masa visceral en paralelo con las muestras que contienen masa visceral. Cualquier partícula detectada en los filtros deben caracterizarse según el tipo y color. Cualquier partícula o fibra que se contabilice se omite del análisis de las muestras que contienen tejido, es decir, en la cuantificación de la muestra se resta el blanco. Se agrega un control adicional para tener en cuenta la contaminación en el aire. Para ello se coloca un papel filtro junto al estereomicroscopio al realizar la inspección visual.

## **6. Procedimiento**

### ***Preparado de la muestra***

- En caso de que los mejillones estén congelados, descongelarlos a temperatura ambiente, luego seleccionar 10 de un rango de tamaño similar, medir el largo máximo (mm) de cada uno con un calibre de precisión y registrarlo en la planilla de datos.
- Desechar el exceso de agua y disecar los mejillines descartando el biso y separando la masa visceral para colocarla en una placa Petri.
- Pesar cada mejillín (g p.v.) y anotarlo en la planilla de datos.

### ***Digestión***

- Colocar cada individuo en viales y agregar 20 mL de KOH al 10% por cada gramo de muestra para digerir el material biológico. La digestión puede hacerse a temperatura ambiente durante 48 h o colocando los viales con la mezcla en un baño a temperatura controlada a 40 °C por hasta que se digiera toda la materia orgánica visible. La solución de digestión debe verse como una solución homogénea.

### ***Filtración***

- Filtrar la solución de digestión al vacío sobre filtros reticulados de nitrato de celulosa de 1,2 µm (Microclar®) (antes de utilizar los filtros, comprobar que no tengan ninguna posible contaminación).
- Calcular la eficiencia de la digestión de la siguiente manera de acuerdo a Dehaut y colaboradores (Dehaut, 2016), ecuación 1

$$Ed \% = 100 - \left( \frac{P_{fd} - P_f}{P_t} \right) \times 100\% \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

P<sub>fd</sub>: peso del filtro cubierto por materia orgánica y residuos luego de la digestión

P<sub>f</sub>: peso del filtro cubierto por materia orgánica y residuos antes de la digestión

P<sub>t</sub>: peso de masa visceral antes de la digestión

- Almacenar los filtros individualmente en placas de Petri etiquetadas y selladas a temperatura ambiente para que se sequen antes de la inspección visual y el análisis posterior.

### ***Inspección visual (propiedades físicas)***

- Inspeccionar los filtros con un microscopio estereoscópico.
- Identificar y contar los microplásticos (de 1 µm 5 mm de tamaño) registrando tipo y color de cada microplástico.
- Reportar el resultado como número de ítems/individuo o ítems/g de masa visceral.

Nota: Se puede usar una aguja encendida para verificar que lo que se observa bajo el microscopio es plástico. Si es plástico, el polímero debería deformarse a diferencia de otras partículas como las partículas de silicato.

Opcional: preceder a una identificación química de los polímeros mediante técnicas como µ-FTIR, µ-RAMAN o pirólisis py-GS/MS. Ver Bessa y col. (Bessa, 2019) para más detalle.

## **Modelos de planillas de datos**

### ***Filtración***

| Muestra | Largo individuo (mm) | Peso masa visceral (g) | Peso filtrado (g) | Eficiencia | Observaciones |
|---------|----------------------|------------------------|-------------------|------------|---------------|
| BO1     |                      |                        |                   |            |               |

### ***Identificación visual***

| Muestra | Peso masa visceral (g) | Color de MP                               | Tipo de MP                               | Observaciones |
|---------|------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------|---------------|
| BO1     |                        | Ej. Transparente, rojo, verde, azul, etc. | Ej. Pellet, fragmento, fibra, film, etc. |               |

## **Determinaciones bioquímicas**

### **Preparación de homogenatos para las determinaciones enzimáticas**

#### **1. Materiales**

- Bisturí, pinzas, instrumental de disección
- Tubos eppendorfs
- Pipetas y puntas
- Homogenizador de teflón

#### **2. Equipo**

- Balanza de precisión (Denver Instrument APX-200)
- Centrífuga refrigerada (Eppendorf Centrifuge 5804 R)
- Freezer de -80 °C

### 3. Reactivos y soluciones

- Buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7,4)
- Agua destilada
- Hielo y bolsas refrigeradas

### 4. Procedimiento

Todos los pasos deben realizarse manteniendo las muestras en frío con hielo y bolsas refrigeradas.

1. Preparar la solución de homogenización buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7,4).

Pesar 1,211 g de Tris-base 50 mM (CAS77-86-1, PM: 121.1 g/mol) y mezclar con 1,753 g NaCl 150 mM (PM: 58.44 g/mol) para luego llevar a 200 mL con agua destilada. Llevar a pH 7.4 con HCl concentrado y mantener en la heladera hasta su utilización.

2. Disecar los mejillines separando la masa visceral de las valvas (remover el biso) con un bisturí.

3. Pesar la masa visceral en una balanza de precisión, homogenizarla y trasladarla a un tubo eppendorf con la solución de buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) en relación 1:6 p/v.

4. Centrifugar los homogenatos a 10000 xg en una centrifuga refrigerada a 4 °C durante 15 min.

5. Recolectar el sobrenadante en eppendorfs.

6. Mantener las muestras a -80 °C hasta la determinación enzimática.

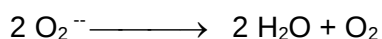
### Medición de la actividad enzimática

#### SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

Basado en: Marklund, S. y Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, 47(3), 469-474.

#### Fundamento

Esta metodología se basa en la inhibición de la oxidación espontánea del pirogallol que ocurre a velocidad constante a pH= 8,8; la solución se vuelve amarilla-amorranada y absorbe a 420nm (puede realizarse a temperatura ambiente, 25 °C). La actividad SOD está representada por una amplia familia de metaloproteínas que se caracterizan por catalizar la reacción de dismutación del radical superóxido.



### 1. Materiales

- Tubos eppendorfs
- Pipetas y puntas

## 2. Equipo

- Balanza de precisión (Denver Instrument APX-200)
- Espectrofotómetro (Metrolab 1700 Uv Vis)

## 3. Reactivos y soluciones

- Buffer Tris-Cacodilato 50 mM pH = 8,8: agregar 690 mg de ácido cacodílico (CAS 75-60-5) a 70 mL de agua bidestilada, llevar a 100 mL con agitación, ajustar pH a 8,8. Agregar 39,4 mg de ácido dietilentriamonopentacético (DTPA CAS 67-43-6) y volver a controlar el pH a 8,8.
- Solución de pirogalol 26 mM en HCl 10 Mm: pesar 32.8 mg de pirogalol (CAS 87-66-1) y disolverlo en 10 mL de HCl 10 mM previamente preparado mezclando 83 µL de HCl concentrado (CAS 7647-01-0) con 10 mL de agua bidestilada.

## 4. Procedimiento

Para calcular 3 puntos de la curva de inhibición y calcular la actividad enzimática, por cada ejemplar se realizan 3 mediciones: un blanco de autooxidación del pirogalol y 2 mediciones de inhibición de SOD a dos volúmenes distintos de muestra. En este caso utilizamos 50 mL y 100 mL, pero el volumen debe ajustarse según el tipo de muestra.

1. Realizar una medición de autooxidación del pirogalol: en una cubeta de cuarzo de 1 mL colocar 880 µL de buffer Tris-Cacodilato 50 mM y llevar a (blanco de muestra). Agregar 200 µL de pirogalol 26 mM, mezclar por inversión y leer a 420 nm por 2 min.
2. Realizar la medición de la inhibición de SOD con dos volúmenes de muestra homogenizada
  - a. Colocar 830 µL de buffer, 50 µL de muestra y llevar a cero (blanco de muestra). Agregar 200 µL de pirogalol y leer la pendiente a 420 nm por 2 min.
  - b. Colocar 780 µL de buffer, 100 µL de muestra y llevar a cero (blanco de muestra). Agregar 200 µL de pirogalol y leer la pendiente a 420 nm por 2 min.

## 5. Cálculos

$$(\Delta SOD / \Delta Ref) \times 100 = PI \text{ (porcentaje de inhibición) por min}$$

$$PI/50 = \text{Unidades en 200 } \mu\text{L de muestra} = \text{UID}$$

$$\text{Actividad específica} = Spa = \text{UID} / \text{mg de proteína}$$

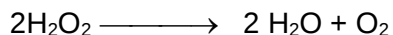
Se define 1 unidad de SOD (U SOD) como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50% de la oxidación autocatalítica del pirogalol/min.

## CATALASA (CAT)

Basado en: Aebi H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126.

## Fundamento

La catalasa cataliza la descomposición de peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno.



### 1. Materiales

- Tubos eppendorfs
- Pipetas y puntas

### 2. Equipo

- Balanza de precisión (Denver Instrument APX-200)
- Espectrofotómetro (Metrolab 1700 Uv Vis)

### 3. Reactivos y soluciones

- Buffer fosfato 50 mM pH = 7
- Peróxido de hidrogeno 0,52 M: tomar 2.656 mL de la solución stock (aprox. 9,8 M) y llevar a 50 mL. En frasco oscuro, conservar hasta un mes en heladera.
- Tritón X-100 (20 % P/V) opcional

### 4. Procedimiento

1. Incubar 0,5 mL de homogenato con 0,5 mL de buffer y 125 µL de tritón X-100 a 0 °C durante 5 min. La acción del tritón X-100, se puede reemplazar congelando y descongelando el homogenato para que se lisen las membranas.
2. Colocar en una cubeta cuarzo 1 mL de buffer con 20 µL de muestra homogenizada.
3. Llevar a cero (blanco de muestra).
4. Agregar 20 µL de peróxido de hidrogeno.
5. Leer 2 min a 240 nm a 25° C (temperatura ambiente).

La concentración final del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la cubeta debe ser aproximadamente 10 mM.

### 5. Cálculos

- Graficar el  $\ln [\text{H}_2\text{O}_2]$  / tiempo
- Calcular la pendiente del gráfico. Esta es  $k'$ .
- Posteriormente se calcula  $k$  (para hígado de rata) =  $4.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

$$[\text{CAT}] = \frac{k' \times \text{Vol final cubeta}}{k \times \text{mg proteína} \times \text{Vol muestra}} = \frac{\text{nmoles}}{\text{mg de proteína}}$$

Se define 1 unidad de CAT (U CAT) como la cantidad de enzima necesaria para catalizar 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$ .

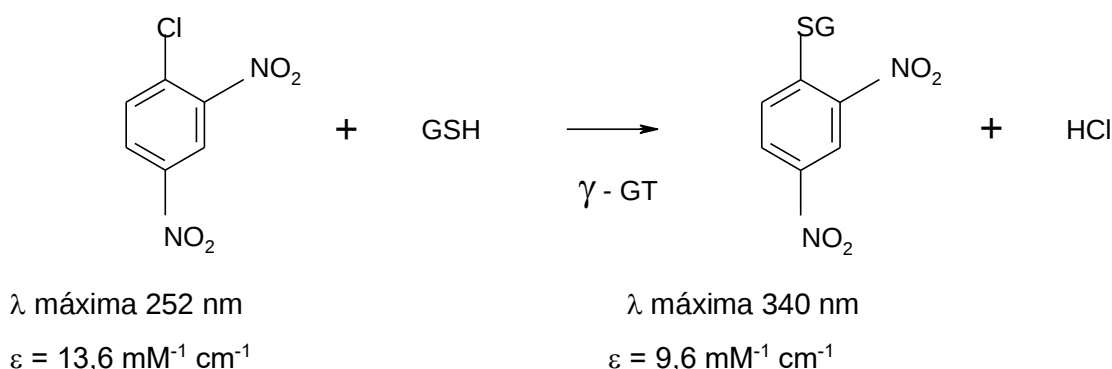
### GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA (GST)

Basado en: Habig, W. H., Pabst, M. J., y Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.

#### Fundamento

Esta enzima, cumple la función de detoxificar los peróxidos de tipo orgánico, asemejando su función con la del glutatión peroxidasa Se-dependiente.

La determinación de la misma se lleva a cabo utilizando el reactivo 1 cloro - 2,4 dinitrobenceno (CDNB), el cual en presencia de glutatión forma GS-dinitro benceno (GS-DNB), que absorbe a 340 nm.



#### 1. Materiales

- Tubos eppendorfs
- Pipetas y puntas

#### 2. Equipo

- Balanza de precisión (Denver Instrument APX-200)
- Espectrofotómetro (Metrolab 1700 Uv Vis)

#### 3. Reactivos y soluciones

- Buffer fosfato 100 mM, pH = 6,5 (68,5 mL de sc A + 31,5 mL sc B, luego agregar 100 mL de agua destilada).

- Glutatión reducido (GSH CAS 70-18-8) 100 mM (153,6 mg en 5 mL de buffer o 30,72 mg en 1 mL buffer, conviene calcular el volumen de acuerdo al número de muestras a medir), preparar antes de usar.
- 1 cloro - 2,4 dinitro benceno (CDNB CAS 97-00-7) 100 mM (101,3 mg en 5 mL de etanol).

#### 4. Procedimiento

1. En una cubeta de cuarzo de 1 mL colocar 970 µL de buffer, 10 µL de GSH, 10 µL de muestra homogenizada.
2. Llevar a cero (blanco de la muestra).
3. Agregar 10 µL de CDNB.
4. Leer 5 min a 340 nm (tomar los valores cada 30 segundos).

#### 5. Cálculos

$$U\ GST/mg\ proteína = \frac{\Delta\ Absorbancia\ (por\ min) \times mL\ cubeta}{9,6\ mM^{-1}\ cm^{-1} \times mL\ muestra}$$

Se define 1 unidad de GST (U GST) como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de GS-DNB por minuto a 25 ° C.

## Acumulación intracelular de lipofuscinas

Basado en: Lowe, D. M., Moore, M. N., y Clarke, K. R. (1981). Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquatic Toxicology*, 1(3-4), 213-226.

#### 1. Materiales

- Porta objetos
- Cubre objetos
- Pinzas y bisturí
- Medio de montaje para congelación (CRIOPLAST®)

#### 2. Equipo

- Crióstato (Leica CM 1850)
- Microscopio óptico (AXIOPLAN 2 Zeiss®) con cámara digital acoplada (Zeiss AXIOCAM HRc).
- Computadora con Programa Image-Pro® Plus

#### 3. Reactivos y soluciones

- Formol calcio: 10 g de cloruro calcio (CAS 10043-52-4) en 100 mL de formaldehído 40 % (40 mL de formaldehído (CAS 50-00-0) en 100 mL de agua destilada) y 900 mL de agua destilada
- Solución de cloruro férrico 1 %: 500 mg de cloruro férrico (CAS 10025-77-1) en 50 mL de agua destilada
- Solución de ferricianuro de potasio 1 %: 500 mg de ferricianuro de potasio (CAS 13746-66-2) en 50 ml de agua destilada
- Solución de reacción 1% cloruro férrico-1% ferricianuro de potasio (3:1, v/v). Debe prepararse en el momento y utilizarse dentro de los 30 minutos.
- Agua destilada
- Ácido acético 1 %: 1 mL de ácido acético (CAS 64-19-7) en 99 mL de agua destilada
- Glicerina (CAS 56-81-5)

#### **4. Procedimiento**

1. Cortar las muestras en un crióstato a 9 µm.
2. Fijar los cortes durante 15 min en formol calcio a 4°C.
3. Enjuagar con agua destilada.
4. Incubar en la solución de reacción 1 % cloruro férrico-1 % ferricianuro de potasio (3:1, v/v), durante 5 min.
5. Lavar durante 1 min en ácido acético 1 %.
6. Enjuagar con agua destilada.
7. Montar en glicerina.

#### **5. Cuantificación**

Seguir las instrucciones del manual de usuario del programa Image-Pro® Plus. Si es necesario corregir las ligeras diferencias en la intensidad de la tinción entre diferentes secciones, la segmentación debe ajustarse manualmente en la primera medición de una sección y luego se automatizar en el resto.

## **Acumulación intracelular de lípidos neutros**

Basado en: Culling, C. F. (1974). *Handbook of histopathological and histochemical techniques*. London: Butterworths.

#### **1. Materiales**

- Porta objetos
- Cubre objetos
- Pinzas y bisturí
- Medio de montaje para congelación CRIOPLAST®

## 2. Equipo

- Balanza de precisión (Denver Instrument APX-200)
- Crióstato (Leica CM 1850)
- Microscopio óptico (AXIOPLAN 2 Zeiss®) con cámara digital acoplada (Zeiss AXIOCAM HRc)
- Computadora con Programa Image-Pro® Plus

## 3. Reactivos y soluciones

- Formol calcio: 10 g de cloruro calcio (CAS 10043-52-4) en 100 mL de formaldehído 40 % (40 mL de formaldehído (CAS 50-00-0) en 100 mL de agua destilada) y 900 mL de agua destilada
- Solución stock de *Oil Red O* 1 %: 0,5 g de *Oil Red O* (CAS 1320-06-5) en 100 mL de isopropanol 99 % (1 mL de agua destilada en 99 mL de isopropanol (CAS 67-63-0))
- Solución de tñido *Oil Red O* 1 %: 60 mL de solución stock de *Oil Red O* 1 % en 40 mL de agua destilada. Debe dejarse reposar durante 10-15 min para estabilizar y filtrarse. El filtrado es estable durante 1-2 horas
- Solución de contracoloración *Fast Green FCF* 1 %: 1 g de *Fast Green FCF* (CAS 2353-45-9) en 100 mL de ácido acético 1 %
- Agua destilada
- Ácido acético 1 %: 1 mL de ácido acético (CAS 64-19-7) en 99 mL de agua destilada
- Isopropanol 60 %: 60 mL de isopropanol (CAS 67-63-0) en 100 mL de agua destilada
- Glicerina (CAS 56-81-5)

## 4. Procedimiento

1. Cortar las muestras en un crióstato a 9 µm.
2. Fijar los cortes durante 10-15 seg en formol calcio a 4 °C.
3. Enjuagar con agua destilada.
4. Secar a temperatura ambiente
5. Lavar en isopropanol (60 %)
6. Incubar en la solución de tñido *Oil Red O* 1 % por 20 min.
7. Diferenciar por goteo con isopropanol 60 % y lavar en agua.
8. Contracolorar con solución de *Fast Green FCF* 1 % durante 10 min.
9. Montar en glicerina.

## 5. Cuantificación

Seguir las instrucciones del manual de usuario del programa Image-Pro® Plus. Si es necesario corregir las ligeras diferencias en la intensidad de la tñción entre diferentes

secciones, la segmentación debe ajustarse manualmente en la primera medición de una sección y luego se automatizar en el resto.

## Inclusión de muestras para histología en resina plástica

### 1. Materiales

- Pinzas y bisturí
- Pipetas y puntas
- Moldes
- Tacos de madera
- Pegamento (POXIPOL® 2 COMPONENTES)

### 2. Reactivos y soluciones

- Alcohol 70°, 80° y 96°
- Kit de inclusión de resina plástica Leica HistoResin®

### 3. Procedimiento

1. Preparar las soluciones del kit de inclusión de resina plástica Leica HistoResin® de la siguiente manera:
  - a. Solución de infiltración: 50 mL de resina + 1 sobre de activador. Mezclar con agitador magnético hasta disolución completa y luego guardar en heladera en un frasco oscuro.
  - b. Solución final: 15 mL de solución de infiltración + 1 mL de endurecedor.
2. Deshidratar las muestras en alcohol 80° durante toda la noche y luego en alcohol 96° por 2 h.
3. Poner las muestras en solución de infiltración durante 2 h.
4. Montar las muestras en los moldes con solución final y el endurecedor. Dejar secar hasta que los tacos de resina estén completamente secos y duros.
5. Desmoldar y pegar los tacos de resina en los tacos de madera rotulados.

## Inclusión de muestras para histología en parafina

### 1. Materiales

- Pincel, pinzas y bisturí
- Moldes plásticos
- Molde plástico de inclusión
- Cuchillas desechables para micrótomos
- Porta y cubreobjetos
- Muestras de tejido fijadas en NBF 10 %

- Balanza de precisión (Denver Instrument APX-200)

## 2. Reactivos y soluciones

- Alcohol 70°, 96° y 100°
- Xileno (Technical 28973.363)
- Parafina (Panreac 253211)
- Albúmina bovina 1 %: pesar 1 g de albúmina de huevo (Fluka 05461) y 1 g de timol (89-83-8) y agregar 100 mL de agua destilada. Realizar una dilución 1:20 en agua destilada al momento de usarla
- Hematoxilina de Harris (Sigma HHS32)
- Eosina amarillenta hidroalcohólica 1% (Panreac 251301.1611)
- Medio de montaje DPX (Fluka 44581)

## 3. Equipo

- Procesador automático de tejido en vacío (Leica ASP300)
- Dispensador de parafina
- Micrótopo automático (Leica RM 2125RT)
- Baño térmico
- Estufa (P Selecta®)

## 4. Procedimiento

1. Deshidratar las muestras en alcohol de acuerdo a la siguiente tabla:

| Reactivo                  | Condiciones                        |
|---------------------------|------------------------------------|
| Alcohol 70°               | 60 min a temperatura ambiente (TA) |
| Alcohol 96°               | 60 min a TA                        |
| Alcohol 96°               | 60 min a TA                        |
| Alcohol 100°              | 60 min a TA                        |
| Alcohol 100°              | 60 min a TA                        |
| Alcohol 100°:Xileno (1:1) | 60 min a TA                        |
| Xileno                    | 60 min a TA                        |
| Xileno                    | 60 min a TA                        |
| Parafina                  | 120 min a 56°                      |

2. Colocar los tejidos en un molde plástico con la orientación deseada y cubrirlos totalmente con parafina derretida.

3. Dejar secar los moldes a temperatura ambiente hasta que la parafina esté completamente dura y luego retirarlos.

# Análisis autometalográfico para la detección de depósitos metálicos

Basado en:

- Instrucciones del fabricante del kit *silver enhancing reagent* de AURION® (R-Gent SE-LM).
- Lowe, D. M., Moore, M. N. y Clarke, K. R. (1981). Effects of oil on digestive cells in mussels: Quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquatic Toxicology*, 1, 213-226.

## 1. Materiales

- Cortes histológicos de resina o parafina (cortados a 5 µm)
- Cubre objetos
- Cubetas y cestas de tinción
- Cámara húmeda

## 2. Equipo

- Microscopio óptico (AXIOPLAN 2 Zeiss®) con cámara digital acoplada (Zeiss AXIOCAM HRc)
- Computadora con Programa Image-Pro® Plus

## 3. Reactivos y soluciones

- Kit *silver enhancing reagent* de AURION® (R-Gent SE-LM)
- Agua destilada
- Hematoxilina de Carazzi: disolver 0,25 g de sulfato doble de aluminio y potasio (7784-24-9) en 400 mL de agua destilada tibia y agregar luego la hematoxilina (CAS 517-28-2) previamente disuelta en 1 mL de alcohol 100°. Finalmente agregar 0,1 g de iodato de potasio (CAS 7758-05-6) y 100 mL de glicerina (CAS 56-81-5)
- Eosina: disolver 0,25 g de eosina (CAS 17372-87-1) en 100 mL de alcohol 70°
- Bálsamo de Canadá (8007-47-4)

## 4. Procedimiento

1. Retirar el Kit *silver enhancing reagent* de AURION® de la heladera y dejar que los reactivos lleguen a temperatura ambiente.
2. Preparar la solución potenciadora con los reactivos revelador y potenciador en partes iguales y aplicar sobre los portaobjetos cubriendo todas las muestras. Dejar actuar durante 20 min manteniendo los cortes en una cámara húmeda (no es necesario dejarlos en la oscuridad).
3. Enjuagar con agua destilada.
4. Contracolorar con Hematoxilina-eosina.
5. Montar en bálsamo de Canadá.

## 5. Cuantificación

1. Observar los portaobjetos en el microscopio óptico con un aumento de 100x y fotografiar 5 secciones elegidas al azar.
2. Utilizar un programa analizador de imágenes (por ej. Image-Pro® Plus) y calcular la densidad de volumen de depósitos metálicos BSD (VvBSD) como  $VvBSD = VBSD/VTi$ , siendo VBSD el volumen de BSD y VTi el volumen total del tejido.

## Tinción de hematoxilina-eosina para muestras incluidas en resina plástica

### 1. Materiales

- Cortes histológicos de resina (cortados a 5 µm)
- Cubre objetos
- Cubetas y cestas de tinción

### 2. Reactivos y soluciones

- Agua destilada
- Hematoxilina de Carazzi: disolver 0,25 g de sulfato doble de aluminio y potasio (CAS 7784-24-9) en 400 mL de agua destilada tibia y agregar luego la hematoxilina (CAS 517-28-2) previamente disuelta en 1 mL de alcohol 100°. Finalmente agregar 0,1 g de iodato de potasio (CAS 7758-05-6) y 100 mL de glicerina (CAS 56-81-5)
- Eosina: disolver 0,25 g de eosina (CAS 17372-87-1) en 100 mL de alcohol 70°
- Bálsamo de Canadá (8007-47-4)

### 3. Procedimiento

1. Hidratar en agua destilada 10 minutos
2. Colorear con hematoxilina de Carazzi 15 minutos
3. Virar en agua corriente
4. Pasaje en agua destilada
5. Colorear con eosina alcohólica 15 minutos
6. Deshidratar en graduación alcohólica ascendente (50, 70, 90, 96 %)
7. Dejar secar y montar en bálsamo de Canadá
8. Observar al microscopio: los núcleos se tiñen de violeta y el citoplasma de color rosa

# Tinción de hematoxilina-eosina para muestras incluidas en parafina

## 1. Materiales

- Cortes histológicos en parafina (cortados a 5  $\mu$ m)
- Cubre objetos
- Cubetas y cestas de tinción

## 2. Reactivos y soluciones

- Agua destilada y corriente
- Xileno
- Alcohol 96°
- Alcohol 100°
- Hematoxilina de Harris (CAS 517-28-2): disolver 0,25 g de hematoxilina en 25 mL de alcohol absoluto y agregar 50 g de sulfato doble de aluminio y potasio (CAS 7784-24-9) en 400 mL previamente disuelto en 500 mL de agua destilada. Poner la solución a hervir y agregar lentamente 1,25 g de óxido de mercurio. Cuando la solución este fría agregar 20 mL de ácido acético
- Eosina: disolver 0,25 g de eosina (CAS 17372-87-1) en 100 mL de alcohol 70°
- Bálsamo de Canadá (8007-47-4)

## - Procedimiento

1. Cortar los bloques de parafina en secciones de 5  $\mu$ m de espesor utilizando un micrótopo electrónico (Leica® RM 2155).
2. Tomar las secciones cuidadosamente con una pinza y ubicarlas en la superficie del baño térmico (45-50 °C) para permitir que se expandan.
3. Ubicar las secciones en los portaobjetos cubiertos con albúmina bovina.
4. Llevar los portaobjetos con las secciones a la estufa a 37 °C y dejar secar por 1 noche hasta que se utilice para la tinción.
5. Se realizó una tinción automática de hematoxilina de Harris y eosina amarillenta hidroalcohólica 1% con un teñidor robótico (Leica autostainer XL) con máquina de portaobjetos incorporado (Leica CV5030). El medio de montaje usado fue DPX (Fluka 44581). El programa de tinción se detalla en la siguiente tabla:

| Reactivo               | Tiempo      |
|------------------------|-------------|
| Xileno                 | 10 min (x2) |
| Alcohol 100°           | 2 min (x2)  |
| Alcohol 96°            | 2 min       |
| Alcohol 70°            | 2 min       |
| Agua destilada         | 5 min       |
| Hematoxilina de Harris | 7 seg       |
| Agua corriente         | 4 min (x2)  |
| Eosina amarillenta     | 2 min       |
| Agua corriente         | 30 seg      |
| Etanol 70°             | 2 min       |
| Etanol 96°             | 2 min       |
| Etanol 100°            | 2 min (x2)  |
| xileno                 | 5 min (x2)  |

## Análisis morfométrico de los túbulos digestivos

Basado en: Bignell, J., Cajaraville, M., y Marigómez, I. (2012) Background document: histopathology of mussels (*Mytilus* spp.) for health assessment in biological effects monitoring, en Davies, I. M. y Vethaak, A. D. (eds) *ICES Cooperative research report n° 315*, 111–120.

### 1. Materiales

- Cortes histológicos de glándula digestiva teñidos con H-E

### 2. Equipo

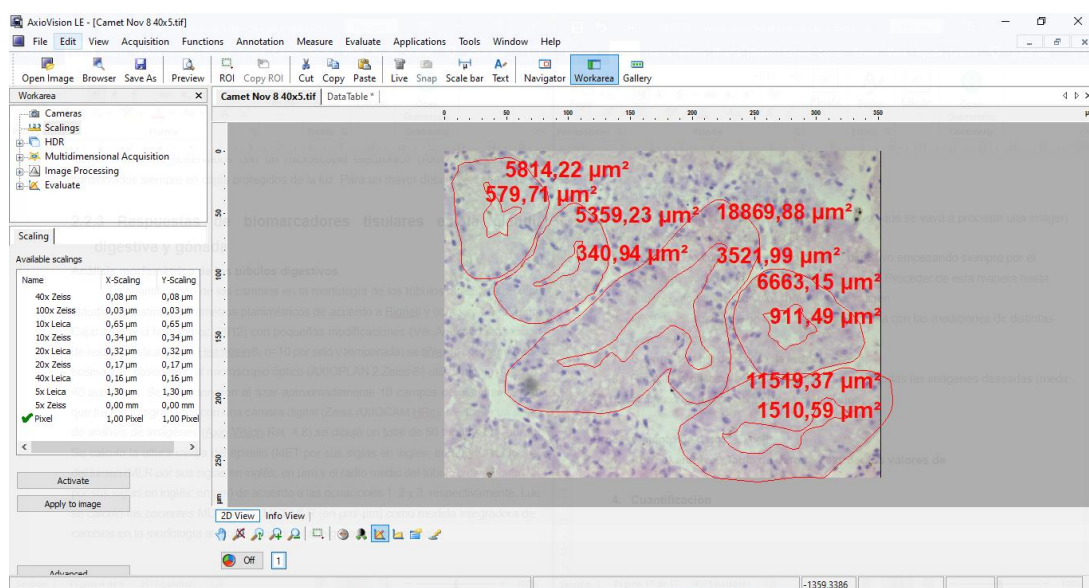
- Microscopio óptico (AXIOPLAN 2 Zeiss®) con cámara digital acoplada (Zeiss AXIOCAM HRc)
- Computadora
- Programa Axio Vision Rel. 4.8
- Programa procesador de hojas de cálculo tipo Excel (Microsoft Office®)

### 3. Procedimiento

#### Mediciones de los túbulos digestivos: Axio Vision Rel. 4.8 (Figura 1)

1. Observar los cortes al microscopio óptico y tomar al azar 10 fotografías de secciones la glándula en aumento de 40x por cada individuo. Importante: registrar la escala a la que las imágenes son tomadas.
2. En una computadora abrir el programa Axio Vision Rel. 4.8 y cargar la escala de trabajo correspondiente.
3. Abrir la imagen de trabajo.

4. Seleccionar la escala correspondiente cada vez que se vaya a procesar una imagen (usar los comandos activar y aplicar).
5. *Measure > Outline*: contornear un túbulo digestivo empezando siempre por el perímetro exterior y luego por el interior (lumen). Proceder de esta manera hasta haber contorneado todos los túbulos de la imagen.
6. *Measure > Create data table*: se creará la tabla con las mediciones de distintas características.
7. Guardar la tabla de datos y la imagen y cerrar.
8. Repetir los pasos 3 a 7 hasta finalizar de medir todas las imágenes deseadas (medir al menos 50 túbulos digestivos por individuo).



**Figura 1:** Vista de la interfase del programa Axio Vision Rel.4.8 para el procesamiento de imágenes.

### Procesamiento de datos: Excel

1. Abrir el archivo “Tabla de datos” y extraer los valores de *Area* y *Perimeter* para calcular los parámetros MLR, MDR y MET de acuerdo a las ecuaciones 2, 3 y 4, respectivamente:

$$MET = 2 (A_o - A_i) / (P_o + P_i) \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$MLR = \sqrt{(A_i / \pi)} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$MDR = \sqrt{(A_o / \pi)} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde:

$A_o$  es el área de sección de todo el perfil del túbulo

$P_o$  es el perímetro de un círculo con área  $A_o$

$A_i$  es el área de sección del perfil del lumen

$P_i$  es el perímetro del círculo correspondiente con área  $A_i$

2. Calcular los cocientes MLR/MET y MET/MLR (en  $\mu\text{m}/\mu\text{m}$ ) para cada individuo.

3. Repetir con el resto de los individuos y calcular la media.
4. Analizar estadísticamente de acuerdo al set de datos.

## Análisis estereológico de la composición celular e integridad del tejido digestivo

Basado en:

- Bignell, J., Cajaraville, M. y Marigómez, I. (2012) Background document: histopathology of mussels (*Mytilus* spp.) for health assessment in biological effects monitoring, en Davies, I. M. y Vethaak, A. D. (eds) *ICES Cooperative research report n° 315*, 111–120.
- Tschanz, S. A., Burri, P. H. y Weibel, E. R. (2011) A simple tool for stereological assessment of digital images: The STEPanizer, *Journal of Microscopy*, 243(1), 47–59.

### 1. Materiales

- Cortes histológicos de glándula digestiva teñidos con hematoxilina-eosina

### 2. Equipo

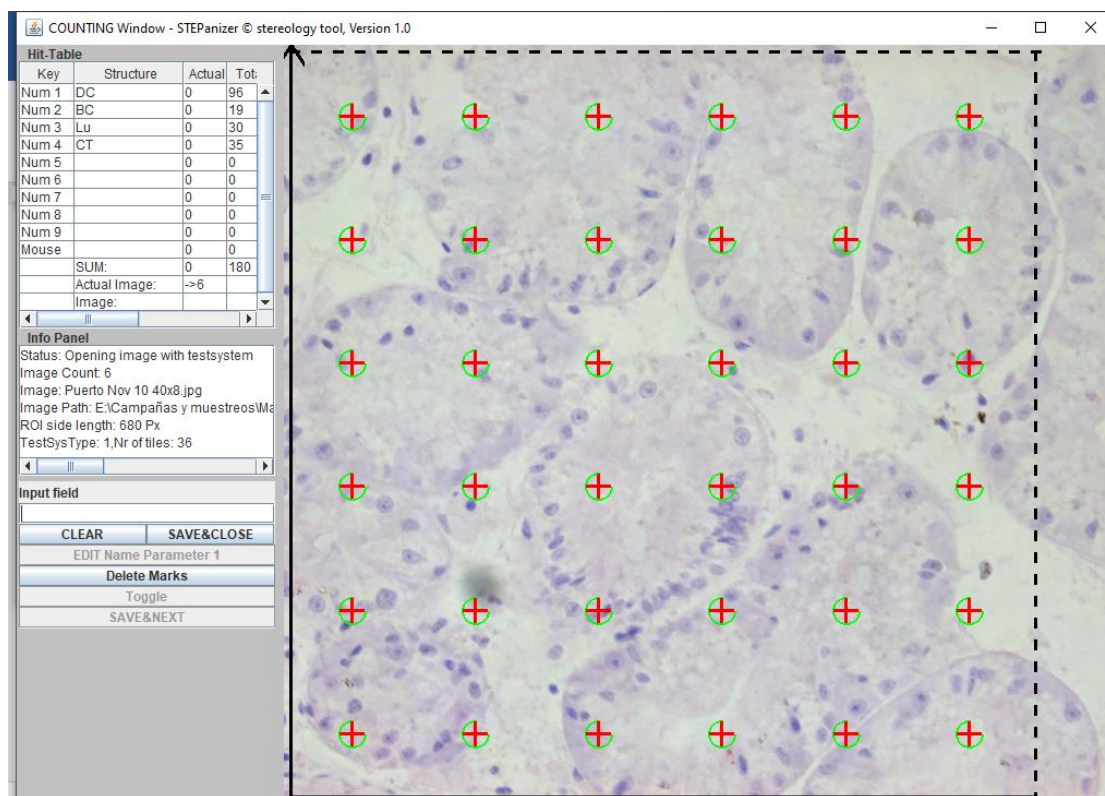
- Microscopio óptico (AXIOPLAN 2 Zeiss®) con cámara digital acoplada (Zeiss AXIOCAM HRc)
- Computadora
- Programa STEPanizer1
- Programa procesador de hojas de cálculo tipo Excel (Microsoft Office®)

### 3. Procedimiento

#### Conteos en el tejido digestivo: STEPanizer1 (Figura 2)

1. Observar los cortes al microscopio óptico y tomar al azar aproximadamente 10 fotografías de secciones la glándula en aumento de 40x por cada individuo. Importante: registrar la escala a la que las imágenes son tomadas.
2. En una computadora abrir el programa STEPanizer1 y en la sección *Test System Properties* seleccionar la opción *Points > 36* (sistema de prueba M36).
3. Cargar la imagen de trabajo haciendo clic en *Browse*. Importante: las imágenes deben estar guardadas en formato .jpg.
4. Hacer clic en *Counting*: se abre la ventana de conteo donde primeramente se deben establecer las teclas (por ej. 1, 2, 3 y 4) que representarán cada uno de los elementos a contar, en este caso célula digestiva, célula basófila, lumen, tejido conectivo.
5. Recorrer la imagen y apretar la tecla correspondiente al elemento que “toque” cada uno de los 36 puntos de la grilla. Al terminar de recorrerla toda, guardar el conteo.
6. Repetir los pasos 3 a 6 hasta completar todas las imágenes correspondientes al mismo individuo y al finalizar hacer clic en *Export* y se generará el archivo Excel con los datos.

7. Repetir los pasos 3 a 7 con el resto de los individuos.



**Figura 2.** Vista de la interfase del programa STEPanizer1 para el procesamiento de imágenes.

### Procesamiento de datos: Excel

1. Abrir el archivo de Excel generado y calcular para cada individuo los parámetros VvBAS y CTD de acuerdo a las ecuaciones 4 y 5, respectivamente.

$$VvBAS = b / (d + b) \text{ (Ecuación 4)}$$

$$CTD = c / (b + d + l) \text{ (Ecuación 5)}$$

Donde:

b es el número de “toques” de células basófilas

d es el número de “toques” de células digestivas

l es el número de “toques” en el lumen o luz del túbulo

c es el número de “toques” en el espacio de tejido conectivo

2. Calcular la media y analizar estadísticamente de acuerdo al set de datos.

## Análisis histopatológico y parasitosis

Basado en:

- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., y Shostak, A. W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The Journal of parasitology*, 575-583.
- Kim, Y., Ashton-Alcox, K., y Powell, E. N. (2006). «Histological techniques for marine bivalve

molluscs: update», en NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25, 97.

### 1. Materiales

- Cortes histológicos teñidos con H-E

### 2. Equipo

- Microscopio óptico (AXIOPLAN 2 Zeiss®)

### 3. Procedimiento

1. Observar los cortes al microscopio óptico.
2. Registrar las alteraciones histológicas y parásitos presentes en la glándula digestiva y tejido gonadal (ver [Índices histopatológicos en glándula digestiva y tejido gonadal](#) como ejemplo de planilla de datos).

3. Utilizar la siguiente escala semicuantitativa para evaluar la frecuencia de aparición de cada alteraciones histológicas y parásitos de cada individuo:

0 = sin alteración presente en ningún campo;

1 = alteración histopatológica leve, presente en <25 %;

2 = alteración histopatológica moderada, presente en 25–75 %;

3 = alteración histopatológica alta, presente en >75 %

4. Calcular la prevalencia de aparición del daño o infección (P) de acuerdo a la ecuación 8.

$$P = n^{\circ} \text{ de individuos afectados} / n^{\circ} \text{ de individuos analizados} \quad (\text{Ecuación 8})$$

5. Calcular la intensidad de infección (I) como el promedio de ocurrencias de cada alteración en los individuos afectados.

## Índices histopatológicos en glándula digestiva y tejido gonadal

Basado en: Costa, P. M., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., et al. (2011). Estuarine ecological risk based on hepatic histopathological indices from laboratory and in situ tested fish. *Marine Pollution Bulletin*, 62, 55-65

### 1. Materiales

- Cortes histológicos de glándula digestiva y tejido gonadal teñidos con H-E

### 2. Equipo

- Microscopio óptico (AXIOPLAN 2 Zeiss®)
- Computadora
- Programa procesador de hojas de cálculo tipo Excel (Microsoft Office®)

### 3. Procedimiento

1. Observar los cortes al microscopio óptico.
2. En la planilla de datos, registrar la intensidad (frecuencia de aparición de cada alteración en cada campo) de la siguiente manera: 0 = sin histopatología en ningún campo; 1 = histopatología leve, presente en <25%; 2 = histopatología moderada, presente en 25–75 % y 3 = histopatología severa, presente en >75 %. (Ver modelos debajo)
3. Teniendo en cuenta el peso de cada alteración, calcular el índice de condición histopatológica de cada individuo a partir de la ecuación 6.

$$IHh = \sum_1^j p_j \times I_{jh} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde:

IHh es el índice histopatológico para el individuo h

p<sub>j</sub> es el peso asignado a la enésima alteración j

I<sub>jh</sub> la intensidad asignada al individuo h para la enésima alteración j

4. Calcular la media del índice (IH) y analizar estadísticamente de acuerdo al conjunto de datos.

### Modelo de planilla de datos

Se muestran a continuación los modelos de planillas para glándula digestiva y para tejido gonadal. En el caso de individuos machos, eliminar la fila de “Atresia oocitaria” en la planilla de tejido gonadal.

| Alteración                                         | Individuo # 1 |            | Individuo # n |            |
|----------------------------------------------------|---------------|------------|---------------|------------|
|                                                    | Peso          | Intensidad | Peso          | Intensidad |
| Infiltración hemocítica                            | 1             |            | 1             |            |
| Aumento del espacio intertubular                   | 1             |            | 1             |            |
| Células pigmentadas en tejido conectivo            | 1             |            | 1             |            |
| Agregados simil-lipofuscinas en células digestivas | 1             |            | 1             |            |
| Hipervacuolización de células digestivas           | 2             |            | 2             |            |
| Hiperplasia de células basófilas                   | 2             |            | 2             |            |
| Granulocitoma                                      | 2             |            | 2             |            |
| Fibrosis                                           | 2             |            | 2             |            |
| Atrofia del epitelio                               | 2             |            | 2             |            |
| Necrosis                                           | 2             |            | 2             |            |

| Alteración                                 | Individuo # 1 |            | Individuo # n |            |
|--------------------------------------------|---------------|------------|---------------|------------|
|                                            | Peso          | Intensidad | Peso          | Intensidad |
| Infiltración hemocítica                    | 1             |            | 1             |            |
| Células pigmentadas en tejido conectivo    | 1             |            | 1             |            |
| Agregados simil-lipofuscinas en los acinos | 1             |            | 1             |            |
| Granulocitomas                             | 2             |            | 2             |            |
| Fibrosis                                   | 2             |            | 2             |            |
| Atresia oocitaria                          | 3             |            | 3             |            |
| Necrosis                                   | 3             |            | 3             |            |

# Desarrollo gametogénico e índice gonadal

Basado en:

- Seed, R. (1969). The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lamellibranchiata) on exposed rocky shores. *Oecologia*, 3, 277- 315
- Kim, Y., Ashton-Alcox, K., y Powell, E. N. (2006). «Histological techniques for marine bivalve molluscs: update», en *NOOA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25*, 97.
- Torroglosa, M., y Giménez, J. (2016). Size at first maturity of *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846) from the South-western Atlantic Ocean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 98(3), 457-462.
- Torroglosa, M., y Giménez, J. (2019). Reproductive strategy of *Brachidontes rodriguezii* (Bivalvia: Mytiloidea) in the South-western Atlantic Ocean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 99(1), 155-162.

## 1. Materiales

- Cortes histológicos de tejido gonadal teñidos con H-E

## 2. Equipo

- Microscopio óptico (AXIOPLAN 2 Zeiss®)
- Computadora
- Programa procesador de hojas de cálculo tipo Excel (Microsoft Office®)

## 3. Procedimiento

1. Observar los cortes al microscopio óptico.

2. Registrar el estadio en cada individuo en base a las siguientes descripciones:

Reposo: inactivo o indiferenciado.

Desarrollo: comienza la gametogénesis, se observan algunas gametas maduras.

Maduro: acinos repletos de gametas maduras.

Puesta: emisión activa de gametas, en algunos acinos se observa el lumen.

Post-puesta: acinos vacíos, se observan algunas gametas residuales.

3. Para el cálculo del índice gonadal (IG) a cada estadio asignar un valor semicuantitativo de la siguiente manera:

1 = reposo; 2 = desarrollo; 3 = maduro; 4 = puesta; 5 = post-puesta

4. Calcular el IG individual como la proporción de los distintos estadios.

5. Calcular el valor total de IG como la sumatoria de los IG individuales dividido el número de individuos analizados.

## Índice de condición del estado de salud general

Basado en: Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Loquès, F., Roméo, M. y Salbert, V. (2007). Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere*, 66, 574–583.

### 1. Materiales

- Pinzas, bisturí, tijeras e instrumental de disección
- Placas de Petri

### 2. Equipo

- Balanza electrónica portátil (SF-700 Digital Scale)

### 3. Procedimiento

1. Cortar los filamentos del biso externos y remover cualquier otro material que pueda tener el individuo por fuera (por ej. pequeñas piedritas)
2. Ubicar el individuo en una placa de Petri limpia.
3. Pesar el individuo y registrar el peso como el peso total (Pt).
4. Con un bisturí abrir las valvas, cortar y descartar el biso interno con una tijera. Con un bisturí, remover la masa visceral, pesarla y registrar el peso (Pmv).
5. Calcular el índice de condición de acuerdo a la ecuación 9.

$$IC = [(Pmv)/(Pt)] \times 100 \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde:

IC es el índice de condición del individuo

Pmv es el peso de la masa visceral (en g)

Pt es el peso total (valva, masa visceral y líquido paleal, en g)

6. Repetir los pasos 1 a 5 hasta completar el n deseado. Calcular la media y realizar los análisis estadísticos correspondientes.

## Supervivencia al aire

Basado en Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Mancinelli, G., Accomando, R., Smaal, A. C., y Orunesu, M. (1995). Stress on stress response: a simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. *Marine Environmental Research*, 39(1-4), 245-248.

### 1. Materiales

- Bandejas plásticas
- Toallas de papel absorbente

- Pinzas

## 2. Procedimiento

1. Preparar la bandeja de plástico con una base húmeda de toallas de papel absorbente.
2. Seleccionar 20 individuos vivos y acomodarlos en la bandeja manteniéndolos a la temperatura y fotoperiodo correspondiente.
3. Examinar los individuos diariamente (aproximadamente a la misma hora) y registrar el número de muertos. Estimular los individuos físicamente con una pinza intentando abrir las valvas, si el individuo no responde al estímulo o no cierra las valvas, considerarlo muerto.
4. Repetir el paso 3 hasta alcanzar el 100% de mortalidad.
5. Calcular las curvas de supervivencia y el parámetro de tiempo de letalidad  $TL_{50}$  (tiempo al cual el 50% de los individuos ha muerto).

## Análisis transcriptómico en *M. galloprovincialis*

Basado en las instrucciones del fabricante de miRNeasy Mini Kit QIAGEN (n° de cat. 217004).  
Mini manual de miRNeasy disponible en: [www.qiagen.com/HB-1277](http://www.qiagen.com/HB-1277)

### ***Extracción y purificación de ARN***

#### 1. Materiales

- Pinzas, tijeras y material de disección
- Limpiador ARN
- Etanol 70° y etanol 100°
- Rotuladores
- Hielo
- Pipetas y puntas con filtro
- Criotubos libres de ARNasa
- Gradillas
- Kit de extracción y purificación miRNeasy Mini Kit QIAGEN (n° de cat. 217004). Manual de miRNeasy disponible en: [www.qiagen.com/HB-1277](http://www.qiagen.com/HB-1277)
- Microesferas de homogenización

#### 2. Equipo

- Homogenizador de tejido (Precellys 24 tissue homogenizer, Bertin technologies)
- Centrífuga refrigerada (Centrifuge 5415 R, Eppendorf)
- Balanza de precisión (Denver Instrument APX-200)

#### 3. Procedimiento

**Antes de comenzar:** limpiar la mesa de trabajo y todos los elementos (pipetas, rotuladores, etc.) e instrumentos de la misma primero con limpiador ARN y luego con etanol 70°. Preparar los *Buffer* RWT y *Buffer* RPE de acuerdo a las instrucciones del manual. Encender la centrífuga y ajustarla a 4 °C.

**Preparación de la muestra:** retirar del freezer las muestras almacenadas a -80 °C en RNAlater. Cortar una pequeña porción de 10 mg aprox. de muestra de glándula digestiva (en el caso de tejido gonadal, usar 30 mg aprox.) y colocarla en un criotubo libre de ARNasa. A menos que se indique lo contrario, mantener siempre las muestras en frío con hielo.

### **Extracción**

1. Añadir 700 µL de reactivo de lisis QIAzol a la muestra, romper y homogenizar utilizando microesferas y un homogeneizador (programa Precellys 5500 2x20).
2. Incubar el homogenato a temperatura ambiente (15–25 °C) durante 5 min.
3. Agregar 140 µL de cloroformo y tapar el tubo de forma segura. Colocar las muestras en una gradilla para tubos Eppendorf y agitarlas al mismo tiempo, enérgicamente durante 15 seg.
4. Incubar a temperatura ambiente durante 3 min.
5. Centrifugar durante 15 min a 12000  $\times g$  (11 400 rpm/rfc) a 4 °C. Se obtendrán 3 fases: proteínas (rosa en la parte inferior), ADN genómico (interfase blanca en el medio), ARN (fase acuosa superior).
6. Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo de recolección. Evitar transferir cualquier interfase. Agregar 1,5 volúmenes (600 µl) de etanol al 100 % y mezclar bien con una micropipeta. A partir de este punto, seguir trabajando con el ARN. (Si se desea realizar la extracción de ADN, una vez que se termine de trabajar con el ARN, transferir la fase de ADN a un Eppendorf nuevo y proceder con el protocolo de extracción de ADN).
- 6'. Recomendación: centrifugar nuevamente para obtener más muestra.
7. Pipetear hasta 700 µL de muestra, incluido cualquier precipitado, en un tubo de recolección de 2 mL (RNeasy® Mini columna de centrifugado). Cerrar la tapa y centrifugar a  $\geq 8000 \times g$  durante 20 seg a temperatura ambiente. Desechar el líquido sobrante y volver a utilizar el tubo de recolección.
8. Pipetear el resto de la muestra en la columna RNeasy Mini Spin y repetir el paso 7: centrifugar a  $\geq 8000 \times g$  (8000 rpm) durante 20 seg a temperatura ambiente. Desechar el flujo continuo y seguir trabajando con la Mini columna de centrifugado.

### **Purificación**

9. Agregar 700 µL de *Buffer* RWT a la mini columna RNeasy. Cerrar la tapa y centrifugar durante 15 seg a  $\geq 8000 \times g$ . Desechar el flujo continuo.

10. Pipetear 500  $\mu\text{L}$  de *Buffer* RPE en la mini columna RNeasy. Cerrar la tapa y centrifugar durante 15 seg a  $\geq 8000 \times g$ . Desechar el flujo continuo.
11. Agregar 500  $\mu\text{L}$  de *Buffer* RPE a la mini columna RNeasy. Cerrar la tapa y centrifugar durante 2 min a  $\geq 8000 \times g$ . Desechar el flujo continuo.
12. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 min para secar aún más la membrana. Opcional: en lugar de centrifugar, secar al aire de 5 a 10 min.

### **Elución**

13. Transferir la mini columna RNeasy a un nuevo tubo de recolección de 1,5 mL. Pipetear 20  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasa directamente en la membrana de la mini columna RNeasy. Cerrar la tapa y centrifugar durante 1 min a  $\geq 8000 \times g$  para eluir.
14. El ARN se encuentra en la elución, desechar la mini columna de centrifugado. Mantener en hielo.
15. Duplicado opcional: si el rendimiento esperado de ARN es  $>30 \mu\text{g}$ , repetir el paso 13 usando 20  $\mu\text{L}$  adicionales de agua libre de ARNasa o usando el eluato del paso 13 (si se requiere una alta concentración de ARN). Reutilizar el tubo de recolección del paso 13. El segundo eluato estará menos concentrado que el primero, pero es una forma de tener un duplicado como respaldo. Este paso se debe realizar siempre trabajando con ADN (obtener 2 duplicados de cada muestra).

### **Cuantificación de ARN**

#### **1. Materiales**

- Papel de limpieza
- Muestras de extracción de ARN
- Agua libre de ARNasa (la misma utilizada en el protocolo de extracción)
- Pipetas y puntas con filtro

#### **2. Equipo**

- Cuantificador de ARN (NanoDrop One, Thermo Scientific)

#### **3. Procedimiento**

Consideraciones antes de medir

- El equipo requiere 1 gota de muestra (2  $\mu\text{L}$ ) pero es capaz de medir en 1  $\mu\text{L}$  si se cuenta con poca muestra.
- Información proporcionada en cada medida: Ácido Nucleico ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ), A260/A280 y A230/260 (superior a 1,8 para muestras de buena calidad), presencia de impurezas (si hay impurezas, utilizar el valor corregido de ácido nucleico).

- Medir siempre de la misma manera: blanco > muestras del sitio 1 > blanco > muestras del sitio 2

### **Medición**

1. Nuevo experimento > ARN.
2. Limpiar ambos pedestales y cargar 2 µl del blanco (agua libre de ARNasa).
3. Cargar muestra > Nombrarla > Medir > Limpiar pedestales con papel. Repetir para todas las muestras del sitio 1.
4. Volver a dejarlo en blanco.
5. Repetir los pasos 1 a 3 para las muestras del sitio 2.
6. Terminar Experimento > Exportar (guardar en un pendrive).

### ***Evaluación de la calidad de la extracción de ARN***

Basado en las instrucciones del fabricante del Agilent RNA 6000 Nano Kit. Disponible en [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2938-90034\\_RNA6000Nano\\_KG.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2938-90034_RNA6000Nano_KG.pdf)

### **1. Materiales**

- Muestras de extracción de ARN
- Agua libre de ARNasa (la misma utilizada en el protocolo de extracción)
- Limpiador de ARNasa (RNase Zap)
- Pipetas y puntas con filtro
- Microtubos libres de ARNasa
- Kit Agilent RNA 6000 Nano Kit. Contiene nanochips de ARN, tubos con cierre de seguridad de 0,5 mL, kit de jeringas y reactivos (escalera, colorante, marcador, matriz de gel), todo para el sistema Agilent 2100
- Placa calentadora de microtubos (AccuBlock® Digital Dry Bath, Labnet)
- Microcentrífuga
- Hielo
- Papel aluminio (para proteger los reactivos cuando se indique que deben evitar la luz)

### **2. Equipo**

- Bioanalizador Agilent 2100. Contiene una estación de chip (*Chip Priming Station*) y un mezclador (Vortex IKA)

### **3. Procedimiento**

1. Limpiar los electrodos del bioanalizador antes y después de trabajar utilizando los chips limpiadores de electrodos RNase Zap y agua libre de RNase.
- 1.1 Pipetear 350 µL de RNase Zap en el chip RNase Zap, colocar el chip en el bioanalizador, cerrar la tapa y esperar 30 seg.

1.2 Pipetear 350  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasa en el chip de agua libre de ARNasa, colocar el chip en el bioanalizador, cerrar la tapa y esperar 30 seg.

2. Preparación del gel filtrado.

2.1 Pipetear 550  $\mu\text{L}$  de matriz de gel Agilent RNA 6000 Nano (rojo) en un filtro giratorio.

2.2 Colocar el filtro giratorio en una microcentrífuga y centrifugue durante 10 min a 1500  $g \pm 20\%$  a temperatura ambiente (para la microcentrífuga Eppendorf, esto corresponde a 4000 rpm).

Alicuotar 65  $\mu\text{L}$  de gel filtrado en tubos de microcentrífuga sin ARNasa de 0,5 mL que se incluyen en el kit. Guardar las alícuotas a 4 °C y utilizarlas en el plazo de un mes desde su preparación. Tomar 1 alícuota cada vez que se necesite ejecutar el protocolo y agregar el colorante azul siguiendo las instrucciones del manual para la preparación.

3. Antes de diluir las muestras, permitir que el colorante concentrado RNA 6000 Nano (azul) alcance la temperatura ambiente durante 30 minutos para preparar la mezcla de gel y colorante.

4. Preparar diluciones de las muestras en microtubos libres de ARNasa y utilizando agua libre de ARNasa (almacenar las extracciones de ARN concentradas originales a -80 °C). Cantidad de muestra necesaria: 25-500 ng/ $\mu\text{L}$ , si se tiene aprox. 1200 ng/ $\mu\text{L}$  hacer una dilución 1:10 (2  $\mu\text{L}$  de muestra: 18  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasa).

5. Prepare la mezcla gel-colorante del kit Agilent RNA 6000 Nano.

5.1 Dejar que el concentrado de colorante Nano RNA 6000 (azul) alcance la temperatura ambiente durante 30 minutos antes de su uso. Proteger el concentrado de colorante de la luz mientras lo lleva a temperatura ambiente.

5.2 Mezclar el colorante concentrado 6000 Nano (azul) durante 10 seg con el vortex. Agregar 1  $\mu\text{L}$  de concentrado de colorante nano RNA 6000 (azul) a una alícuota de 65  $\mu\text{L}$  de gel filtrado.

5.3 Tapar el tubo, agitar bien e inspeccionar visualmente la mezcla adecuada de gel y colorante. Guardar el concentrado de colorante a 4 °C en la oscuridad nuevamente.

5.4 Girar el tubo durante 10 minutos a temperatura ambiente a 13000  $g$  (para la microcentrífuga Eppendorf, esto corresponde a 14000 rpm). Usar la mezcla preparada de gel y colorante en el plazo de un día.

6. Carga de la mezcla de gel y colorante.

6.1 Retirar un nuevo chip RNA Nano de su bolsa sellada.

6.2 Colocar el chip en la estación de cebado de chips (*chip priming station*).

6.3 Pipetear 9,0  $\mu\text{L}$  de la mezcla de gel y colorante en el fondo del pocillo marcado con una G.

6.4 Ajustar el temporizador (incluido en el kit) a 30 seg, asegurase que el émbolo esté colocado en 1 mL y luego cerrar la estación de cebado del chip.

6.5 Presionar el émbolo de la jeringa hacia abajo hasta que quede sujeto por el clip. Esperar exactamente 30 seg y liberar el émbolo con el mecanismo de liberación del clip.

- 6.6 Esperar 5 seg y luego llevar lentamente el émbolo nuevamente a la posición de 1 mL.
- 6.7 Abrir la estación de cebado de chips y pipetear 9 µL de la mezcla gel-colorante en cada pocillo marcado con una G. Descartar el resto de la mezcla gel-colorante.
7. Cargar el marcador Agilent RNA 6000 Nano Marker: pipetear 5 µL del marcador (verde) en el pocillo marcado con el símbolo de una escalera y en cada uno de los 12 pocillos para muestra.
8. Desnaturalizar las muestras con calor en la placa calefactora 1 min a 70 °C.
9. Cargar la escalera y las muestras.
- 9.1 Antes de usar, descongelar alícuotas de la escalera y mantenerlas en hielo.
- 9.2 Pipetear 1 µL de escalera de ARN en el pocillo marcado con el símbolo de una escalera.
- 9.3 Pipetear 1 µL de cada muestra en cada uno de los 12 pocillos de muestra.
- 9.4 Pipetear 1 µL del marcador RNA 6000 Nano Marker (verde) en cada pocillo de muestra que no fue utilizado.
- 9.5 Ubicar el chip horizontalmente en el adaptador del mezclador IKA Vortex (incluido en el kit) y automáticamente comenzará a mezclar el chip a 2400 rpm durante 1 min.
- 9.6 Correr el chip en el bioanalizador Agilent 2100 dentro de los 5 min.

## ***Síntesis de ADNc***

### **1. Materiales**

- Pipetas y puntas con filtro
- Microtubos
- Gradillas
- Kit de síntesis de ADNc (cDNA Synthesis Agilent kit)
- Hielo

### **2. Equipo**

- Microcentrífuga
- Termociclador (SimpleAmp Thermal Cycler)
- Cuantificador de ADNc (NanoDrop One, Thermo Scientific)

### **3. Procedimiento**

**Consideraciones antes de comenzar:** utilizar los valores del ARN medido (de la cuantificación NanoDrop) y diluir las muestras para obtener la concentración de ARN deseada. El valor deseado podría ser de 1-2 µg para obtener una buena calidad de ADNc (5 como máximo). En el presente trabajo la concentración de ARN deseada fue de 2 µg de muestra (2 µg = 1,6 µL) calculado como: Volumen de ARN para producir ADNc = Concentración de ARN deseado/Concentración de ARN medido). El volumen total del templado de ARN, el H<sub>2</sub>O y los cebadores debe ser igual a 14,2 µL (máximo).

1. Preparar diluciones de las muestras de ARN para que tengan 2 µg (en un tubo diferente).
2. Girar de 5 a 10 segundos todos los tubos del kit y colocarlos en hielo en el orden en que se utilizarán.

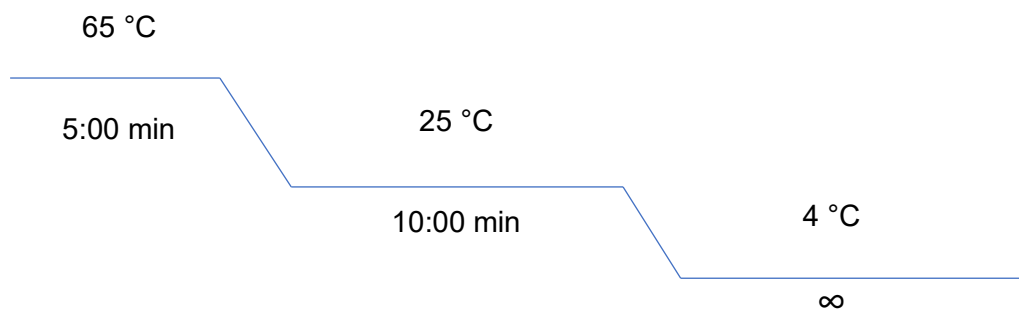
### Pre RT-PCR

1. Colocar los reactivos en los microtubos exactamente en el siguiente orden para obtener un volumen final de 14,2 µL

- 1) 1,6 µL de muestra (equivalente a 2 µg de ARN)
- 2) 9,6 µL de agua libre de ARNasa
- 3) 3 µL de cebadores random (constante)

Volumen total = 14,2 µL

2. Correr el siguiente programa en el termociclador:



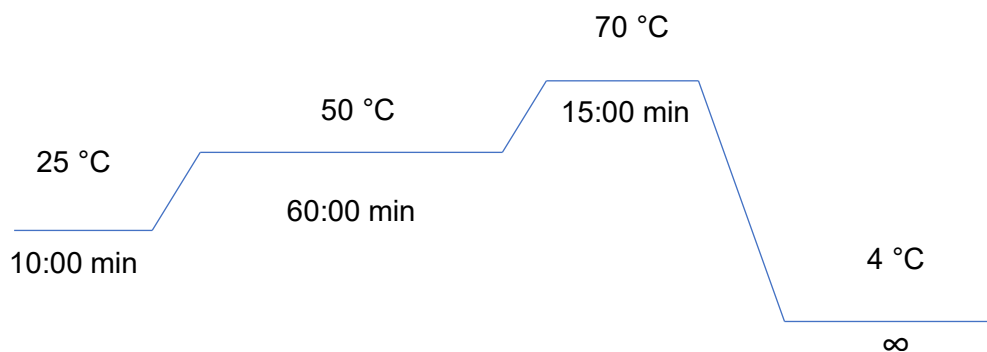
### RT-PCR

1. Retirar los microtubos del termociclador y agregar los reactivos exactamente en el siguiente orden:

- 1) 2 µL RT *Buffer*
- 2) 2 µL 100 mM DTT
- 3) 0,8 µL 100 mM dNTP mix
- 4) 1 µL Affinity Script RT

Volumen total = 20 µL (14,2 + 5,8)

2. Correr el siguiente programa en el termociclador



Finalmente, comprobar la calidad del ADNc utilizando el cuantificador NanoDrop One en el programa dsDNA (ADN doble cadena). Mantener las muestras en hielo durante la medición y utilizar la misma agua libre de DNasa del kit para realizar los blancos. Almacenar las muestras de ADNc a -40 °C.

### **qPCR en tiempo real**

Basado en:

- Rojo-Bartolomé, I., Martínez-Miguel, L., Lafont, A. G., Vílchez, M. C., Asturiano, J. F., Pérez, L., et al. (2017). Molecular markers of oocyte differentiation in European eel during hormonally induced oogenesis. *Comparative Biochemistry Physiology. -Part A Mol. Integrated Physiology* 211, 17-25.
- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402-408.

### **1. Materiales**

- Pipetas y puntas
- Microtubos
- Gradillas
- Muestras de ADNc (y cebadores específicos)
- Placa de 384 pocillos (Applied Biosystems)

### **2. Equipo**

- Termociclador en tiempo real (ViiA7 Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific)
- Computadora con programa para análisis de datos de qPCR en tiempo real

### **3. Procedimiento**

1. Diseñar los cebadores específicos para SYBR Green qRT-PCR utilizando la información de las secuencias de mRNA disponibles en la base de datos de GenBank (NCBI) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

2. Colocar los reactivos en cada pocillo exactamente en el siguiente orden para obtener un volumen final de 20  $\mu$ L. Incluir además un control negativo de no templado (NTC) (Realizar por triplicado)

- |                                             |   |                            |
|---------------------------------------------|---|----------------------------|
| 1) 10 $\mu$ L de colorante SYBR Green       | } | Volumen total = 20 $\mu$ L |
| 2) 8 $\mu$ L de mezcla cebador ARNasa libre |   |                            |
| 3) 2 $\mu$ L de muestra de ADNc             |   |                            |

3. Amplificación: correr el siguiente programa en el termociclador

Etapas 1 (1 ciclo): 50 °C por 2 min

Etapas 2 (1 ciclo): 95 °C por 10 min

Etapla 3 (40 ciclos): 95 °C por 15 seg seguidos de 1 min a la temperatura de fusión (Tm) de cada gen

4. Curva de disociación: continuar la reacción de amplificación con un paso de disociación a 95 °C por 15 seg, 60 °C por 15 seg y 95 °C por 15 seg.

5. Calcular la eficiencia de la reacción de cada placa mediante el uso de la curva estándar de muestras en pool de ADNc en diluciones seriadas de acuerdo a la ecuación 10. La especificidad de la reacción se determina por la presencia de un solo pico en la curva de fusión y la ausencia de dímeros de cebadores.

$$E = \left[ 10^{\left(-\frac{1}{m}\right)} \right] - 1 \text{ (Ecuación 10)}$$

Donde:

E es la eficiencia de amplificación de la reacción de qPCR

m es la pendiente de la curva estándar de la reacción de qPCR

6. Calcular los niveles de transcripción relativos se calcularon a partir de la ecuación 11 y calibrar con una referencia.

$$RQ = (1 + E)^{-\Delta\Delta Ct} \text{ (Ecuación 11)}$$

Donde:

RQ es la cantidad relativa del nivel de transcripción de cada gen en la muestra

E es la eficiencia de amplificación de la reacción de qPCR

$\Delta\Delta Ct$  es la diferencia entre los valores de Ct del gen de interés y los valores de Ct de la curva estándar cuando el logaritmo del número de copias generadas es cero en la muestra. La transcripción relativa de cada gen se normalizó con la concentración de ADNc medida utilizando un kit de cuantificación (Quan-it OliGreen ssDNA AssayKit). Expresar los resultados como el  $\log_2$  RQ

## Frecuencia de micronúcleos y brotes nucleares en hialinocitos

Basado en:

- Bolognesi, C., y Fenech, M. (2012). Mussel micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 7(6),1125-37.
- Duroudier N., Katsumiti A., Mikolaczyk M., Schäfer J., Bilbao E., y Cajaraville M. P. (2021). Cell and tissue level responses in mussels *Mytilus galloprovincialis* dietarily exposed to PVP/PEI coated Ag nanoparticles at two seasons. *Science of the Total Environment*, 750 (6),141303

### 1. Materiales

- Pinzas y bisturí

- Pipetas y puntas
- Jeringas descartables de 1 mL y agujas
- Tubos Eppendorf®
- Cubetas de tinción
- Contador manual de 4 dígitos (Z169021-1EA, Merck)

## **2. Equipo**

- Microscopio óptico (Olympus BX50)
- Citocentrífuga (Cytopro® Cytocentrifuge, ELLtech Biomedical Systems)
- Balanza de precisión (Denver Instrument APX-200)

## **3. Reactivos y soluciones**

- Kit de tinción Hemacolor® (CAS 67-56-1, Merck)
- Medio de montaje DPX (Fluka 44581)
- Solución antiagregante (EDTA salino-acuosa 10 mM, pH 7,4): mezclar 25 g de NaCl (CAS 7647-14-5) con 0,292 g de EDTA (CAS 6381-92-6) y llevar a volumen de 1 L con agua destilada.

## **4. Procedimiento**

1. Insertar cuidadosamente una punta en la posición posterior de los mejillones cerca del músculo aductor para mantener una pequeña abertura por la cual insertar la jeringa para la extracción de la hemolinfa.
2. Extraer la hemolinfa del músculo aductor posterior con una jeringa de 1 mL y transferirla a un tubo Eppendorf.
3. Diluir 50 µL de hemolinfa con la solución antiagregante en una proporción de 1:9 (50 µL de hemolinfa: 450 µL solución antiagregante). Mantener en hielo para reducir la agregación celular.
4. Citocentrifugar 200 µL de la dilución de hemolinfa a 700 rpm durante 2 min y luego dejar que los portaobjetos se sequen al aire durante 20 min.
5. Teñir los portaobjetos con el kit comercial Hemacolor® siguiendo las instrucciones del fabricante: Hemacolor solución A durante 1 min, Hemacolor solución B durante 2 min, Hemacolor solución C durante 2 min. aclarar con abundante agua destilada y secar al aire. Una vez que los portaobjetos se hayan secado, montarlos con medio de montaje DPX.
6. Observar al microscopio óptico con aumento de 100x y realizar el conteo y evaluación de hialinocitos de acuerdo al criterio de Bolognesi y Fenech (2012).
7. Proceder al análisis estadístico de acuerdo al set de datos.

# Ensayo Cometa

Basado en: Katsumiti, A., Gilliland, D., Arostegui, I., y Cajaraville, M. P. (2015). Mechanisms of toxicity of Ag nanoparticles in comparison to bulk and ionic Ag on mussel hemocytes and gill cells. *PLoS One*, 10, e0129039.

## 1. Materiales

- Pinzas y bisturí
- Pipetas y puntas
- Jeringas descartables de 1 mL y agujas
- Tubos Eppendorf®
- Cubetas de tinción
- Portaobjetos Trevigen CometSlide™

## 2. Equipo

- Microscopio de fluorescencia (Olympus DP74)
- Balanza de precisión (Denver Instrument APX-200)
- Centrífuga (Beckman Coulter Microfuge 20 Centrifuge)
- Tanque de electroforesis (Comet Assay® ES 4250-050-ES, Trevigen)

## 3. Reactivos y soluciones

- Solución antiagregante (EDTA salino-acuosa 10 mM, pH 7,4): Pesar 25 g de NaCl (CAS 7647-14-5), 0,292 g de EDTA (CAS 6381-92-6) y llevar a volumen de 1 L con agua destilada.
- Solución de lisis Comet Assay™ (Trevigen, 4250-050-01)
- *Buffer* de electroforesis (pH 13): preparado el día anterior. Pesar 17,991 g NaOH (1310-73-2) 150 mM con 374,58 g de EDTA (CAS 6381-92-6) 300 mM y llevar a volumen de 3 L con agua destilada.
- *Buffer* de neutralización buffer (pH 7,5): preparar en el momento. Pesar 18,912 g de Tris-HCl (CAS 1185-53-1) 400 mM y llevar a volumen de 300 mL con agua destilada.
- Colorante SafeGreen™ (G108-G)

## 4. Procedimiento

1. Insertar cuidadosamente una punta en la posición posterior de los mejillones cerca del músculo aductor para mantener una pequeña abertura por la cual insertar la jeringa para la extracción de la hemolinfa
2. Extraer la hemolinfa del músculo aductor posterior con una jeringa de 1 mL y transferirla a un tubo Eppendorf.

3. Diluir 250 µL de hemolinfa con la solución antiagregante 10 mM en una proporción de 1:1 (250 µL de hemolinfa: 250 µL solución antiagregante). Mantener en hielo para reducir la agregación celular.
4. Centrifugar 200 µL de la dilución de hemolinfa a 300 xg durante 10 minutos.
5. Desechar el sobrenadante y mezclar 200 µL de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5 % con el *pellet*.
6. Colocar 1 gota de 15 µL de la suspensión en cada pocillo del portaobjetos Trevigen CometSlide™.
7. Enfriar los portaobjetos a 4 °C durante 10 minutos en la oscuridad. Para ello, colocar los portaobjetos en una bandeja y cubrirla para protegerlos de la luz y el polvo.  
*Los pasos del 7 al 11 deben realizarse a 4 °C en la oscuridad.*
8. Sumergir los portaobjetos en solución de lisis a 4 °C en las cubetas de tinción durante 1 hora.
9. Lavar los portaobjetos (dos veces) con agua destilada y transferirlos al tanque de electroforesis que contenga *buffer* de electroforesis.
10. Incubar los portaobjetos durante 20 minutos para permitir que el ADN alcalino se desenrolle.
11. Ejecutar la electroforesis (1 V/cm, 30 min) en el mismo *buffer* de electroforesis.
12. Neutralizar los portaobjetos con *buffer* de neutralización frío durante 10 minutos.
13. Fijar las células durante 3 min en metanol a -20 °C en la oscuridad.
14. Secar los portaobjetos en la oscuridad.
15. Conservar a 4 °C hasta la puntuación (no más de 2 semanas).
16. Puntuación: Teñir los portaobjetos con 20 µL de reactivo Safe-Green y analizarlos en un microscopio de fluorescencia (excitación λ 270-290/ emisión λ 530 nm). Utilizar el software ImageJ FIJI (*plug in* OpenComet) para determinar la extensión del daño en el ADN (por ejemplo, % de ADN de la cola) en las preparaciones de portaobjetos.

## Medición de la actividad enzimática de palmitoil-CoA oxidasa

Basado en: Small, G.M., Burdett, K. y Connock, M. J. (1985). A sensitive spectrophotometric assay for peroxisomal acyl-CoA oxidase. *Biochemistry Journal*, 227, 205-210.

### 1. Materiales

- Tubos eppendorfs
- Criotubos
- Pipetas y puntas
- Microesferas de homogenización
- Parafilm

## 2. Equipo

- Balanza de precisión (Denver Instrument APX-200)
- Espectrofotómetro UV/Vis (BioTek® Eon)
- Homogenizador de tejido refrigerado (Precellys 24 tissue homogenizer, Bertin technologies con unidad Cryolys® Evolution)
- Centrífuga refrigerada (Allegra X-30R Centrifuge, Beckman Coulter)
- Baño térmico (Mettler)

## 3. Reactivos y soluciones

### **Buffer de homogenización: TVBE pH 7,6 (para 1 L)**

- NaHCO<sub>3</sub> (CAS 144-55-8) .....84 mg
- EDTA (CAS 6381-92-6) 0,1 M.....10 mL
- Alcohol absolute (CAS 64-17-5) .....1 mL
- Triton X-100 (CAS 9002-93-1) (10%) .....1 mL
- dH<sub>2</sub>O..... llevar a 1 L

### **Medio de reacción (para 400 mL, para aprox. 60 muestras con 2 mediciones c/u)**

- <sup>1</sup>Buffer potasio fosfato 0,5 M; pH 7,4 ..... 8 mL
- <sup>2</sup>Leuco-DCF (CAS 2044-85-1) ..... 2 mL
- <sup>3</sup>HRP (CAS 9003-99-0) (1200 U/mL) .....1 mL
- Sodium azide (CAS 26628-22-8) (N<sub>3</sub>Na) 4 M ..... 1 mL
- Triton X-100 (10%) ..... 800 µL
- dH<sub>2</sub>O ..... llevar a 400 ml y mezclar bien

Proteger esta solución de la luz directa para evitar la fotooxidación de la diclorofluoresceína. Alicuotar 1,9 mL en criotubos y almacenar en la oscuridad a -40 °C por no más de 2 semanas.

#### <sup>1</sup>Buffer potasio fosfato 0,5 M; pH 7,4

- solución A: disolver 680 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 10 mL de agua destilada
- solución B: disolver 1140 mg de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 3H<sub>2</sub>O en 10 mL de agua destilada
- agregar la solución A a la B a pH 7,4

#### <sup>2</sup>Leuco-DCF: preparar en un vaso de precipitados y cubrir con papel aluminio

Disolver 3,25\* mg de leuco-DCF en 250 µL DFA y agregar 2,25 mL de NaOH 0,01 M.

\*Pesar lo que se pueda y hacer los cálculos en base a ese peso.

<sup>3</sup>HRP (1200 U/mL): calcular la cantidad necesaria en base a las unidades. Por ej. si es 181 u/mg, y se necesitan 1200 u/mL, la cuenta sería la siguiente:

181 u \_\_\_\_\_ 1 mg

$$1200 \text{ u (x4)} \text{ \_\_\_\_\_\_ } \times = 4800 \text{ u} / 181 \text{ u} = 25,519 \text{ mg}$$

### **Palmitoil-CoA 3mM (sustrato)**

Disolver todo el contenido del frasco en agua destilada hasta obtener una solución 3mM. Preparar alícuotas de 10 µL de la solución madre de Palmitoil-CoA y almacenarlas a -20°C (el frasco de 5 mg disueltos en 1,658 mL de dH<sub>2</sub>O sirve para 165 alícuotas aprox.).

### **Procedimiento**

#### Preparación de la muestra

1. Retirar el TVBE de la heladera 30-60 min antes de comenzar.
  2. Sacar muestras del congelador (no más de 10 a la vez) y homogeneizarlas con microesferas de homogenización en crioviales en una proporción de 4 mL de TVBE: 1 g de glándula digestiva.
- Mantener siempre las muestras y los reactivos fríos en hielo durante todo el protocolo.
3. Transferir el homogenato a un tubo nuevo sin las microesferas de homogenización.
  4. Centrifugar las muestras a 500 xg durante 15 min a 4°C.
  5. Recover 100 µl of the supernatant and dilute it cold homogenisation buffer (TVBE) in a proportion of 1:5 (100 µl sample: 400 µl TVBE). Recuperar 100 µL del sobrenadante y diluirlo en TVBE frío en una proporción de 1:5 (100 µl muestra: 400 µl TVBE).
  6. Almacenar el resto del sobrenadante a -20 °C para la medición de la concentración de proteína.

#### Medición espectrofotométrica de la actividad de palmitoil-CoA oxidasa (AOX1)

1. Descongelar los criotubos con las alícuotas de 1,9 mL del medio de reacción (2 por cada muestra) 15 min antes de iniciar el ensayo en baño térmico a 25°C (protegidos de la luz). Las alícuotas no se pueden descongelar más de 30 min (no descongelar todo a la vez).
2. Añadir 100 µL de la muestra diluida (1 muestra: 5 TVBE) a un criotubo que contenga 1,9 mL de medio de reacción descongelado (RM). Mezclar en vortex e incubar en el baño durante 5 min a 25 °C.
3. Tomar 1 mL de la solución (muestra + RM) y colocarlo en una cubeta (blanco). Siempre colocar la cubeta blanco en el compartimiento posterior del espectrofotómetro.
- 3'. Tomar otro 1 mL de la solución y colocarlo en una cubeta y agregar 10 µL de palmitoil-CoA 3 mM (sustrato). Cubrirlo con un parafilm y mezclarlo antes de colocarlo en el compartimiento delantero.
4. Con ambas cubetas dentro del espectrofotómetro, leer la absorbancia a partir de los 20 seg, durante 260 seg (4 min) a 502 nm. La absorbancia debe ser lineal y aumentar con el tiempo.
5. Restar Abs<sub>260sec</sub> y Abs<sub>20sec</sub> para obtener el valor final de Absorbancia de la muestra.

6. Repetir los pasos 2, 3 y 4 hasta obtener 2 valores finales de Absorbancia de la muestra con una diferencia no mayor al 10%. Reportar el valor de absorbancia para cada muestra como la media de las 2 mediciones.

#### Cálculo de la actividad de AOX1

Utilizar la ecuación 3

$$\frac{mU\ AOX1}{mL} = \frac{\Delta Abs}{min} \times \frac{Vr}{Vm} \times \frac{dilución}{0,091} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde:

mU AOX1/mL son las unidades de AOX1 por mL

$\Delta Abs/min$  es el delta de absorbancia por minuto

Vr es el volumen de reacción (2 mL)

Vm es el volumen de la muestra (0,1 mL)

dilución es el factor de dilución utilizado

0,091 es el factor de extinción

Finalmente, los resultados se expresan en relación a la cantidad de proteína de cada muestra por mL como mU AOX1/mg de proteína.