

Daño Genotóxico en *Macrobrachium Tenellum* (Smith, 1871) en Canales de Riego Agrícola en Guasave, Sinaloa, México.

Pedro Hernández Sandoval¹

pedro.hernandez@uadeo.mx

<https://orcid.org/0000-0001-7005-4555>

Universidad Autónoma de Occidente, Unidad
Regional Los Mochis, Departamento académico
de Ciencias Naturales y Exactas.
México

Abygail Lagarda Escárrega

lagarda_aby@hotmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-7470-2174>

Universidad Autónoma de Occidente, Unidad
Regional Los Mochis, Departamento
académico de Ingeniería y Tecnología
México

Jesús Roberto Alanis Escalant

jeroales25@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0009-9334-0103>

Universidad Autónoma de Occidente, Unidad
Regional Los Mochis, Departamento académico
de Ciencias Naturales y Exactas
México

María del Carmen Martínez Valenzuela

maria.martinezv@uadeo.mx

<https://orcid.org/0000-0003-1784-9986>

Universidad Autónoma de Occidente, Unidad
Regional Los Mochis, Departamento
académico de Ciencias Naturales y Exactas.
México

Jeovan Alberto Ávila Díaz

jeovan.avila@uadeo.mx

<https://orcid.org/0000-0002-7692-4547>

Universidad Autónoma de Occidente, Unidad
Regional Los Mochis, Departamento académico
de Ingeniería y Tecnología
México

David Váldez Martínez

david.martinez@uadeo.mx

<https://orcid.org/0000-0001-9471-4001>

Universidad Autónoma de Occidente, Unidad
Regional Los Mochis, Departamento
académico de Ingeniería y Tecnología
México

Arturo Arciniega Galaviz

marco.arciniega@uadeo.mx

<https://orcid.org/0000-0001-8532-7130>

Universidad Autónoma de Occidente, Unidad
Regional Los Mochis, Departamento académico
de Ingeniería y Tecnología
México

¹ Autor principal.

Correspondencia: pedro.hernandez@uadeo.mx

RESUMEN

Macrobrachium tenellum es una especie económicamente importante, pero la contaminación natural y antropogénica pone en riesgo su presencia en la naturaleza. Los organismos se colectaron en canales de riego agrícola en Guasave, Sinaloa, México, se transportaron al laboratorio de Genotoxicología de la Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis. Los organismos se sacrificaron por descenso de temperatura, se extrajo su hepatopáncreas, se maceró y una muestra se suspendió en 200 µL de solución fisiológica (PBS) a 37 °C, se tomó una alícuota para realizar el ensayo cometa. Se analizaron 36 organismos. El 69% presentó daño en ADN (72% hembras - 28% machos). Se observó una relación inversa entre talla y daño genotóxico. Se determinó que no existe relación entre el sexo y el daño genotóxico. El daño fue en igual proporción en hembras ovígeras y no ovígeras. *M. tenellum* tiene potencial para ser utilizado como biomonitor de sitios contaminados con mezclas de plaguicidas agrícolas.

Palabras clave: langostino; genotoxicología; ensayo cometa; agua dulce; xenobiótico.

Genotoxic Damage in *Macrobrachium Tenellum* (Smith, 1871) in Agricultural Irrigation Canals in Guasave, Sinaloa, México.

ABSTRACT

Macrobrachium tenellum is a species that generates significant economic benefits, but natural and anthropogenic contamination puts its presence in nature at risk. The organisms were collected in agricultural irrigation canals in Guasave, Sinaloa, and transported to the UAdeO UR Los Mochis, Genotoxicology laboratory. The organisms were sacrificed by lowering the temperature, their hepatopancreas was extracted, which was macerated, a sample was suspended in 200 μ L of physiological solution (PBS) at 37 °C, and an aliquot was taken to perform the comet assay. 36 organisms were analyzed. 69% presented DNA damage (72% female and 28% male). An inverse relationship between size and genotoxic damage was observed. It was determined that there is no relationship between sex and genotoxic damage. The damage was in equal proportion in ovigerous and non-ovigerous females. *M. tenellum* has the potential to be used as a biomonitor for sites contaminated with mixtures of agricultural pesticides.

Keywords: *prawn; genotoxicology; comet assay; freshwater; xenobiotic*

Artículo recibido 22 Agosto 2023

Aceptado para publicación: 29 Septiembre 2023

INTRODUCCIÓN

Un enorme número de compuestos tóxicos antropogénicos y de origen natural se descargan en ambientes acuáticos, ahí se absorben, acumulan y biotransforman mediante procesos biológicos y/o químicos, estos compuestos pueden ser absorbidos por los organismos a través de las branquias, la piel o el tracto digestivo (Gutiérrez 2013, Kolarova y Napiórkowski 2021). Una vez dentro del organismo, estas sustancias tóxicas interactúan en diversos procesos fisiológicos y rutas metabólicas (Vanzella et al. 2007, Ramos et al. 2018). Un agente genotóxico puede provocar alteraciones genéticas en los seres vivos con el bloqueo de la replicación, así como la aparición de mutaciones que derivan en patologías y cambios en las características de dichos organismos (Suárez y Soberón 2009) como carcinogénesis, desarrollo de malformaciones (teratogénesis), además de afectar los mecanismos de reparación del material genético (Obiakor et al. 2012). La evaluación genotóxica de ambientes acuáticos es un mecanismo clave para transformar el principio de desarrollo sostenible en medidas concretas (Gutiérrez 2013, Ghosal et al. 2016). Existen numerosas y variadas formas para evaluar la toxicidad provocada por la contaminación de una determinada sustancia: el estudio de la mortalidad, estudios a largo plazo, valoración de los efectos subletales de una sustancia, evaluación de las alteraciones del desarrollo, crecimiento, reproducción, fisiología y bioquímica del organismo tratado y su comportamiento, finalmente estudios a nivel poblaciones, comunidades o incluso ecosistemas (Graney y Giesy 1986). Al respecto, el ensayo del cometa y la prueba de micronúcleo (MN) constituyen indicadores ecológicos de alerta temprana, que pueden evaluarse antes del inicio de alteraciones mucho más graves que afectan la viabilidad de los organismos a nivel individual y comunitario (Mohti et al. 2012, García-Nieto et al. 2014). *Macrobrachium tenellum* es un crustáceo dulceacuícola de interés comercial nativo de cuerpos de agua dulce cercanos al pacífico mexicano (Brusca y Brusca 1990, García-Guerrero et al. 2013), sin embargo, las actividades antropogénicas como la agricultura, minería e industria (Gerhardt et al. 2002, Nurul-Akhma et al. 2012) han aumentado el ingreso de sustancias contaminantes a sistemas acuáticos donde habita, y ponen en riesgo no solo a la biota de estos ecosistemas, sino a las personas que consumen directa e

indirectamente recursos que ellos proveen. De acuerdo con Snyder (2000) y Sousa y Petriella (2007), la mejor forma de evaluar el efecto de un genotóxico en un crustáceo es el análisis de su hepatopáncreas, ya que es el principal órgano para la digestión y la desintoxicación de xenobióticos en los invertebrados acuáticos, no obstante, la mayoría de las investigaciones desarrolladas al respecto se han realizado en vertebrados, y en invertebrados de la familia palemonidae son muy escasas (De melo et al. 2019), se puede mencionar a Montagna y Collins (2005), quienes reportaron en *Palaemonetes argentinus* reducción en la tasa de consumo de oxígeno y excreción de amonio, y Hong et al. (2018) encontraron daño genotóxico y estrés oxidativo en *Macrobrachium nipponensis*. La falta de estudios disponibles con este grupo de crustáceos es muy preocupante, ya que sus hábitos de vida y alimentación hacen que estén en contacto regular con xenobióticos en sedimentos y agua, lo que representa un riesgo para las poblaciones de estos organismos (De melo et al. 2019). Pontasch y Cairns (1991) señalan que los organismos nativos son mejores biomonitores que las especies de prueba estándar porque desempeñan un papel ecológico en los ecosistemas acuáticos en los que se producen, y se ha demostrado que las especies indígenas son mejores indicadores de los factores de estrés antropogénicos, lo que proporciona resultados más realistas desde el punto de vista ambiental (Gerhardt 2000). Por tal razón, el objetivo de esta investigación fue determinar el daño genotóxico en *M. tenellum* en canales de riego agrícola.

METODOLOGÍA

Recolecta de organismos

Se colectaron 36 organismos adultos de langostino *Macrobrachium tenellum*, en un canal de riego permanente que abastece de agua a tierras agrícolas en Guasave, Sinaloa (25° 24' 12.50'' Norte y 108° 27' 28.07'' Oeste; a 5 msnm). La colecta se realizó de manera manual con atarrayas de 2.54 cm de luz de malla y de 3 m de diámetro.

Trabajo de laboratorio

Los organismos se llevaron al laboratorio de Genotoxicología de la Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis, fueron trasladados en dos cajas de plástico con 60 L de

agua del sitio de captura con aireación constante y con trozos de malla (0.5 m²) utilizada como sustrato, también se agregaron tubos de Policloruro de Vinilo (PVC) de 2.54 cm de diámetro y cinco cm de longitud a manera de refugio, a cada langostino se midió longitud total (L.T.) (vernier ®Truper, análogo) y peso total (P.T.) con balanza Shimadzu (mod AY220, ±0.1 mg), se mantuvieron por 12 h en tres cajas de plástico de 60 L de capacidad, a temperatura ambiente, con aireación constante (blower 0.5 HP, Rietschle –Aleman ®) y trozos de malla. Se determinó sexo, etapa reproductiva y estadio de muda en la que se encontraron según criterio de Cabrera (1983). Los organismos se sacrificaron por descenso de temperatura, y posteriormente, mediante disección, se extrajeron los hepatopáncreas, los cuales se maceraron dentro de tubos eppendorf (1.6 mL) para obtener sus células, la muestra se suspendió en 200 µL de solución fisiológica (PBS) a 37 °C y se tomaron alícuotas con las que se realizaron electroforesis unicelular alcalina, también conocida como ensayo cometa de acuerdo con metodología de Tice et al. (2000) y Speit y Hartmann (2005).

En un microtubo (eppendorf de 1.6 mL) se colocaron 50 µL de la muestra y se adicionó a una alícuota de 50 µL de agarosa de bajo punto de fusión (0.5% en amortiguador de fosfatos pH 7.5), a 37 °C y se mezcló. Posteriormente se transfirió por goteo a un portaobjetos esmerilado con una monocapa de agarosa (1% en amortiguador de fosfatos pH 7.5). Se realizaron dos geles por cada organismo. Se colocaron para su solidificación en una lámina fría sobre hielo durante cinco minutos, se introdujeron en una caja Koplin con solución de lisis final fría recién preparada (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, Triton X-100 1%, DMSO 10%, 10 mM Tris y ajustado a pH=10) durante 30 min y a una temperatura de 8 °C. Los portaobjetos fueron transferidos a una cámara de electroforesis horizontal (Comet-40 System, SCIE-PLAS) con solución amortiguadora de electroforesis (300 mM NaOH, 1mM EDTA, pH 13).

Se mantuvo en reposo por 20 min bajo luz amarilla (40 W, Osram) a temperatura ambiente. El corrimiento de las muestras se realizó a 25 v ajustados a 300 mA durante 20 min. Las muestras se lavaron tres veces durante cinco min con solución neutralizante (0.4M Tris a pH 7.5). Posteriormente se fijaron con metanol absoluto durante cinco min a 4 °C, se secaron a temperatura ambiente. Las

células se tiñeron con 50 µL de solución de bromuro de etidio (10%, Promega) bajo luz amarilla, se taparon con cubreobjetos y se colocaron en una cámara oscura y húmeda.

Para detectar daño al ADN, las laminillas se examinaron en un microscopio (Axio ImagerA.2, Zeiss), con fluorescencia (lámpara X-Cite, EXFO y filtro de 560 nanómetros, Zeiss). Los parámetros examinados para determinar daño al ADN fueron: frecuencia y porcentaje de células dañadas/células sin daño (células con y sin cometa) en 50 células observadas al azar por laminilla y el tamaño de la cola, que fue determinado mediante el software “Comet Assay IV” (Perceptive Instruments).

Análisis estadístico

A los grupos de datos resultantes de las frecuencias de tamaño de cabeza y de cauda (cometas) se aplicaron pruebas de normalidad (Saphiro-Wilkins, $p > 0.05$), posteriormente análisis t de Student ($p < 0.05$) ó “U” de Mann Whitney ($p < 0.05$), y modelo de regresión lineal simple ($p < 0.05$) con el programa Estadístico Minitab (v.14, Minitab Inc).

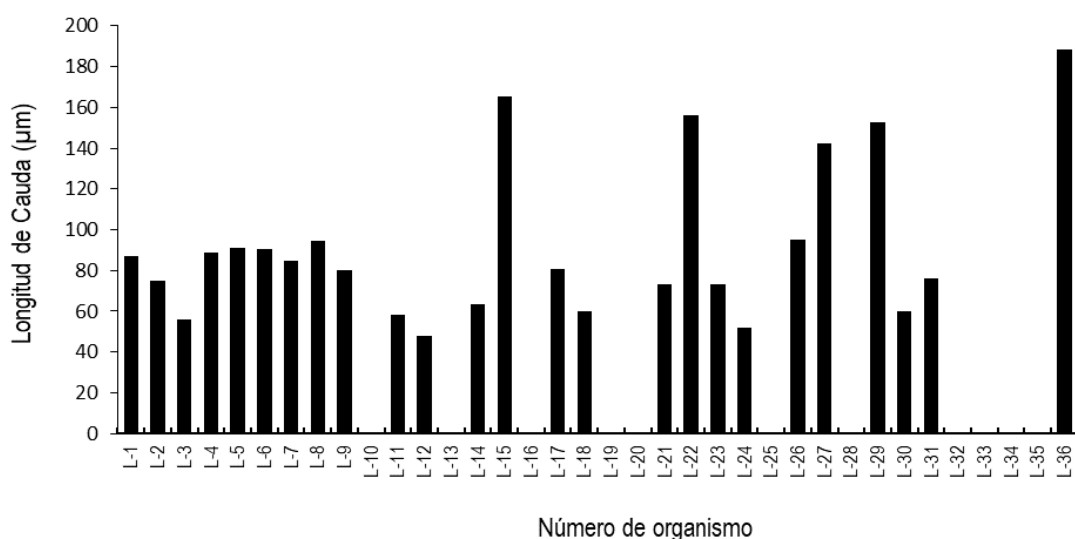
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron 36 organismos con un peso promedio de 11.61 g (± 0.95 g), y longitud total media de 12.16 cm (± 2.00 cm). La proporción sexual fue de 1:2.3 (♂:♀). Del total de organismos analizados, el 69% presentaron daño en ADN, de los cuales el 72% fueron hembras y el 28% machos. El daño genotóxico se encuentra representado por la longitud de la cauda producida en células de hepatopáncreas analizadas (Figura 1). El uso agrícola de tierras adyacentes a cuerpos de agua continentales, han demostrado que aumentan la posibilidad de contaminación de este debido principalmente a la escorrentía (Webb 2011).

La presencia de plaguicidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y metales pesados en las aguas pluviales han demostrado efectos negativos en el crecimiento, tamaño, reproducción y la supervivencia de crustáceos de agua dulce y marinos (Mothershead y Hale 1992, Oberdorster et al. 2000, Leight et al. 2005). Los efectos de los efluentes en una comunidad zoológica pueden persistir mucho después que los parámetros físico-químicos hayan vuelto a la normalidad, dado que los ecosistemas necesitan de un periodo de tiempo para recuperarse (López-Barea 1995). Por ejemplo, la

entrada de las descargas de nitrógeno disuelto total a algunas bahías de Miami osciló entre 144 y 151,546 t en un año, dependiendo de la proximidad a las poblaciones humanas y de la precipitación pluvial estacional (Caccia y Boyer 2007). El daño identificado en el DNA mediante el ensayo cometa puede surgir por varios mecanismos incluyendo roturas de cadena simple (SSB) y de doble cadena (DSB), enlaces cruzados, sitios apurínicos/apirimidinicos (AP) y la incompleta reparación por escisión al eliminar las diversas lesiones inducidas en el DNA como aductos (Zuñiga 2009).

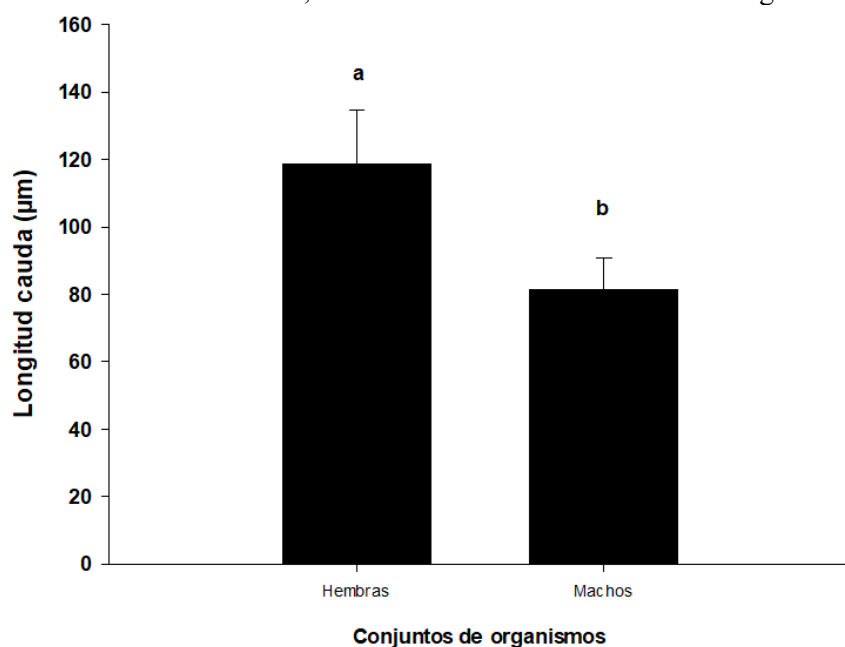
Figura 1. Daño genotóxico identificado en la longitud de cauda (μm) de cada organismo analizado (N=36).



El daño detectado en el ADN de *M. tenellum* confirma el efecto de condiciones estresantes en el ambiente, y aunque la variación extrema de parámetros físico-químicos por sí mismos provocan daño al ADN (Mothershead y Hale 1992, Morris y Oliver 1999), al reproducirse estas condiciones en laboratorio no se ha registrado el mismo nivel de daño que el provocado por plaguicidas, metales pesados y otros (Malev et al. 2010). Qiu et al. (2011) reportaron en el camarón blanco *L. vanamnei* que el estrés térmico (en condiciones de laboratorio) provocó en promedio una cauda de 10.96 ± 5.79 en hemocitos, mientras que en este trabajo la cauda formada fue de 91.71 ± 7.68 en células de hepatopáncreas, siendo un contraste muy evidente, posiblemente la diferencia sea debida al origen de las células analizadas, tal y como indican Sousa y Petriella (2007) y Snyder (2000) al afirmar que el hepatopáncreas, es el principal órgano para la digestión y la desintoxicación de xenobióticos en los

invertebrados acuáticos, aparte de ser muy sensible a los cambios ambientales, al respecto Lavarias et al. (2011), indicaron que las defensas antioxidantes de *M. borellii*, principalmente en el hepatopáncreas, se vieron significativamente afectadas por la contaminación por hidrocarburos acuáticos, independientemente de la temporada. En otro caso se observó que cuando *L. vannamei* es expuesto a hipoxia aguda, aumentan sus niveles de daño del ADN en los tejidos de branquias, hepatopáncreas y hemolinfa, y se encontró también que estos cambios pueden volver al nivel normal después de un período de reoxigenación, pero no se indica la existencia de diferencias entre sexos dentro de la misma especie (Li et al. 2016). En este trabajo al comparar la longitud de la cauda en células de hepatopáncreas de hembras y machos (Figura 2), se encontró mayor daño en hembras ($p < 0.05$).

Figura 2. Longitud promedio de cauda en células dañadas de hepatopáncreas por sexo de *Macrobrachium tenellum*, se observan diferencias estadísticas significativas (t-test $p < 0.05$).



Se observó una elevada correlación entre el Peso Total - Longitud Total con el daño genotóxico en machos, sin embargo, esta correlación no se observó en las hembras, pero si se encontró un factor de correlación considerablemente elevado entre estas medidas biométricas y la longitud de la cauda en hembras ovígeras (Tabla 1), respecto al daño genotóxico por sexo, se encontró que hembras mostraron un mayor daño que machos, a pesar de que se encontraban cerca de la talla máxima reportada para la

especie (Ruíz-Santos 1988), esto no concuerda con lo expresado por Malev et al. (2010), ya que ellos reportaron que adultos (36.6 ± 13.2 g) de ambos sexos de *Astacus leptodactylus* no mostraron diferencias estadísticas significativas en el daño genotóxico, fisiológico e inmunológico por el efecto al incremento de temperatura, exposición a aire y privación de alimento, posiblemente el efecto de sustancias alquilantes de plaguicidas disueltos en el agua provoquen un mayor efecto en los crustáceos y aún más en hembras que en machos, sin embargo en *A. leptodactylus* no se evaluó esto.

Tabla 1. Constantes de modelo de regresión lineal simple aplicado a grupos de datos biométricos de machos y hembras adultos de *Macrobrachium tenellum* con daño genotóxico.

Machos	a	b	R²	N
Longitud de Cauda (µm) – Peso Total (g)	187.04	-03.9939	0.8591	7
Longitud de Cauda (µm) – Longitud Total (cm)	315.3	-17.568	0.9229	
Hembras				
Longitud de Cauda (µm) – Peso Total (g)	166.09	-09.421	0.1913	13
Longitud de Cauda (µm) – Longitud Total (cm)	207.5	-13.041	0.0599	
Hembras ovígeras				
Longitud de Cauda (µm) – Peso Total (g)	534.7	-45.803	0.5467	5
Longitud de Cauda (mm) – Longitud Total (cm)	1240	-123.11	0.7481	

Webb (2011) encontró que en adultos de *Palaemonetes australis*, la exposición a pyreno indujo la actividad de ethoxycoumarin O-deethylase (ECOD), 8-oxo-dG solo en machos, hipotéticamente en hembras no se observó esa respuesta ECOD, ya que el pyreno se incorporó vía materna a las proteínas del vitelo de los oocitos, sin embargo, menciona que es necesario contar con un mayor número de organismos de ambos sexos al momento de la colecta de organismos, ya que los resultados son confusos. Collins et al. (1998) reportaron daño oxidativo al ADN con diferencias estadísticas significativas entre sexos y regiones del mundo en seres humanos, a pesar de estar distanciados evolutivamente ambos taxa, también presentan similitudes. Kuzmick et al. (2007) encontraron que cuando especímenes de *Palaemonetes pugio* son expuestos de forma crónica a residuos de la

combustión de carbón (CCR) se provoca daño en ADN en células hepatopancreáticas (incremento de longitud, porcentaje de la longitud y momento de la cauda), no obstante, los organismos adultos son más resistentes que juveniles y larvas al observarse mayor mortalidad en esos grupos. Investigaciones sobre el uso de ensayo cometa para evidenciar el daño generado por exposición a aguas contaminadas con residuos de productos agrícolas en crustáceos de agua dulce es limitada, en nuestros resultados se encontró que las hembras presentan un mayor daño genotóxico que los machos, esto concuerda con Kuzmick et al. (2007) quienes reportaron que larvas y juveniles de *Palaemonetes pugio* presentan mayor daño, por otro lado, los machos de esta especie alcanzan mayor talla que las hembras, de acuerdo a los resultados aquí reportados sobre análisis del daño genotóxico entre hembras no se observaron diferencias estadísticas significativas entre normales y con masa ovígera ($p > 0.05$), al respecto no se encontraron antecedentes, y tal vez sea necesario aumentar el número de organismos a analizar. También se encontró una relación inversamente proporcional entre el aumento de talla y la presencia de daño, lo cual significa que al aumentar la talla (peso y/o longitud), el daño genotóxico disminuye en todos los casos. Solamente en las hembras en estado normal no se observó tan claramente esta relación, sin embargo, si se observó la tendencia, al respecto Kuzmick et al. (2007), reportaron en *Palaemonetes pugio*, muy baja supervivencia en larvas, pero mayor en juveniles y más aún en adultos, sin embargo, al someter a condiciones crónicas los adultos, aumentaron su tasa de mortalidad, lo cual sugiere que los más pequeños son más sensibles a los contaminantes que provocan daño genotóxico.

CONCLUSIONES

Se logró detectar moderado daño genotóxico en células hepatopáncreáticas de adultos del langostino *Macrobrachium tenellum*. En esta investigación y en las condiciones descritas se logró determinar que existe una marcada relación entre el sexo y el daño genotóxico, este fue mayor en hembras. Se encontró que existe una relación inversa entre el daño a ADN y la talla de los langostinos, entre más grandes los organismos, menos daño fue detectado. Al determinar que el daño genotóxico se puede identificar en esta especie, se puede decir que *M. tenellum* es un adecuado bioindicador de sitios

contaminados con mezclas de plaguicidas agrícolas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Brusca, R.C., y Brusca, G.J. (1990). Invertebrates. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA. 936p.
- Cabrera, P.J. (1983). Carácter práctico para diferenciación de sexos en *Macrobrachium tenellum* (Crustacea: Decapoda: Natatia). Revista de Biología Tropical, 31: 159-160.
<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/25140>
- Caccia, V.G., y Boyer, J.N. (2007). A nutrient loading budget for Biscayne Bay, Florida. Marine Pollution Bulletin, 54: 994-1008. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.02.009>
- Collins, A.R., Gedik, C.M., Olmedilla, B.A., Southon, S., y Bellizzi, M. (1998). Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates. The FASEB Journal, 12: 1397-1400. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9761783/>
- De Melo, M.S., Dos Santos, T.P.G., Jaramillo, M., Nezzi, L., Rauh Muller, Y.M., y Nazari, E.M. (2019). Histopathological and ultrastructural indices for the assessment of glyphosate-based herbicide cytotoxicity in decapod crustacean hepatopancreas. Aquatic Toxicology, 210: 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.007>
- García-Guerrero, M.U., Becerril-Morales, F., Vega-Villasante, F., y Espinosa-Chaurand, L.D. (2013). Los langostinos del género *Macrobrachium* con importancia económica y pesquera en América Latina: conocimiento actual, rol ecológico y conservación. Latin american journal of aquatic research, 41(4): 651-675. <https://doi.org/10.3856/vol41-issue4-fulltext-3>
- García-Nieto, E., Juárez-Santacruz, L., García-Gallegos, E., Tlalmis-Zempoalteca, J., Romo-Gómez, C., y Torres-Dosal, A. (2014). Genotoxicological response of the common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to spring water in Tlaxcala, Mexico. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 93(4): 393-398. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1318-2>
- Gerhardt, A. (2000). Biomonitoring of polluted water. Trans Tech Publications Ltd. Zurich. 301p.
- Gerhardt, A., Janssens de Bisthoven, L., Mo, Z., Wang, C., Yang, M., y Wang, Z. (2002). Short-term

re-sponses of *Oryzias latipes* (Pisces: Adrianichthyidae) and *Macrobrachium nipponense* (Crustacea: Palaemonidae) to municipal and pharmaceutical waste water in Beijing, China: survival, behaviour, biochemical biomarkers. *Chemosphere*, 47: 35–47.

[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00223-5)

Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T.K., y Ahn, Y. (2016). Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A Review. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1-27. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369>

Graney, R.L., y Giesy, J.P. (1986). Effects of long-term exposure to pentachlorophenol on the free amino acid pool and energy reserves of the freshwater amphipod *Gammarus pseudo-limnaeus* Bousfield (Crustacea, Amphipoda). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 12: 233-251. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(86\)90015-1](https://doi.org/10.1016/0147-6513(86)90015-1)

Gutiérrez, J.M. (2013). Micronúcleos en peces como indicadores de calidad ambiental en estuarios de la costa uruguaya. Tesis de licenciatura. Montevideo Uruguay. Universidad de la república Uruguay. Fac. de ciencia. 61 pp.

<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/37770>

Kolarova, N., y Napiórkowski, P. (2021). Trace elements in aquatic environment. Origin, distribution, assessment and toxicity effect for the aquatic biota. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 21 (4): 655-668. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2021.02.002>

Kuzmick, M.C.L., Hopkins, W.A., y Rowe, C.L. (2007). Effects of coal combustion residues on survival, antioxidant potential, and genotoxicity resulting from full-lifecycle exposure of grass shrimp (*Palaemonetes pugio* Holthius). *Science of the Total Environment*, 373: 420-430. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.11.009>

Lavariás, S., Heras, H., Pedrini, N., Tournier, H., y Ansaldo, M. (2011). Antioxidant response and oxidative stress levels in *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae) exposed to the water-soluble fraction of petroleum. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 153: 415-421. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.02.002>

- Leight, A.K., Scott, G.I., Fulton, M.H., y Daugomah, J.W. (2005). Long term monitoring of grass shrimp *Palaemonetes* spp. population metrics at sites with agricultural runoff influences. *Integrated Comparative Biology*, 45: 143-150. <https://doi.org/10.1093/icb/45.1.143>
- Li, Y., Wei, L., Cao, J., Qiu, L., Jiang, X., Li, P., Song, Q., Zhou, H., Han, Q., y Diao, X.. (2016). Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere*, 144: 234-240. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.051>
- Lopez-Barea, J. (1995). Biomarkers in ecotoxicology: an overview. *Archives of toxicology. Supplement* 17: 57- 79. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79451-3_6
- Malev, O., Rut, M., Maguire, I., Tambuk, A., Ferrero, E.A., Lorenzon, S., Göran, I.V. y Klobučar. (2010). Genotoxic, physiological and immunological effects caused by temperature increase, air exposure or food deprivation in freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology*, 152: 433-443. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.07.006>
- Mohti-Azmah, Shuhaimi-Othman, M., y Gerhardt, A. (2012). Use of the multispecies freshwater bi-omonitor to assess behavioral changes of *Poecilia reticulata* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) and *Macrobrachium lanchesteri* (Decapoda: Palaemonidae) in response to acid mine drainage: laboratory exposure. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(9): 2505-2511. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/em/c2em10902f>
- Morris, S., y Oliver, S. (1999). Circulatory, respiratory and metabolic response to emersion and low temperature of *Jasus edwardsii* simulation studies of commercial shipping methods. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 122: 299-308. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00003-3](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00003-3)
- Mothershead, R.F., y Hale, R.C. (1992). Influence of ecdysis on the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in field exposed blue crabs (*Callinectes sapidus*). *Marine Environmental Research*, 33 (2): 145-156. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(92\)90138-C](https://doi.org/10.1016/0141-1136(92)90138-C)

- Nurul-Akhma, Z., Shuhaimi-Othman, y Azmah, M. (2012). Use of multispecies freshwater biomonitor to assess behavioural changes of guppy, poecilia reticulata and freshwater prawn, Macrobrachium lanchesteri in response to leachate from landfill. Sains Malays, 41(5): 573-583. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/em/c2em10902f>
- Oberdorster, E., Rice, C.D., y Irwin, L.K. (2000). Purification of vitellin from grass shrimp Palaemonetes pugio, generation of monoclonal antibodies, and validation for the detection of lipvitellin in crustacea. Comparative Biochemistry and Physiology C, 127: 199-207. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(00\)00146-8](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(00)00146-8)
- Obiakor, M.O., Okonkwo, J., Nnabude, P., y Ezeonyejiaku, C. (2012). Ecogenotoxicology: Micronucleus assay in fish Erythrocytes as in situ aquatic pollution biomarker: A review. Journal of Animal Science Advances, 2(1): 123-130. <https://typeset.io/papers/ecogenotoxicology-micronucleus-assay-in-fish-erythrocytes-1ophmcsxxp>
- Pontasch, K.W., y Cairns, J. (1991). Multispecies toxicity tests using indigenous organisms: predicting the effects of complex effluents in streams. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 20: 103-112. <https://doi.org/10.1007/BF01065335>
- Qiu, J., Wei-Na, W., Li-juan, W., Yu-Feng, L., y An-Li, W. (2011). Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei exposed to acute low temperature stress. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 154: 36-41. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.02.007>
- Ramos-Treviño, J., Bassol-Mayagoitia, S., Hernández-Ibarra, J.A., Ruiz-Flores, P., y Nava-Hernández, M.P. (2018). Toxic effect of Cadmium, lead, and Arsenic on the sertoli cell: Mechanisms of damage involved. DNA and Cell Biology, 37: 600-608. <https://doi.org/10.1089/dna.2017.4081>
- Snyder, M.J. (2000). Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: Recent advances and future directions. Aquatic Toxicology, 48: 529-547. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00085-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00085-0)

- Sousa, L.G., y Petriella, A.M. (2007). Functional morphology of the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Decapoda): Influence of environmental pollution. *Revista de Biología Tropical*, 55: 79-86. <https://doi.org/10.15517/rbt.v55i0.5808>
- Speit, G., y Hartmann, A. (2005). The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. In: Phouthone K, Grant SG (eds) *Methods of molecular biology*. Totowa, Nueva Jersey pp: 85-95. <https://doi.org/10.1385/1-59259-973-7:275>
- Suárez, J.E., y Soberón, N.E. (2009). Método rápido de detección y evaluación de agentes genotóxicos (patente de invención con examen previo). Oficina española de patentes y marcas. 2p.
- Tice, R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, C., y Sasaki, Y.F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 206-221. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J)
- Vanzella, T.P., Martínez, C.B.R., y Cólus, I.M.S. (2007). Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research*, 631: 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.04.004>
- Webb, D. (2011). Freshwater shrimp (*Palaemonetes australis*) as a potential bioindicator of crustacean health. *Environ Monit Assess*, 178: 537-544. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1711-1>
- Zuñiga, V.L. (2009). Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en bio-monitorización humana. Tesis de doctorado. Universidad de Barcelona. 243 pp. <https://www.tdx.cat/handle/10803/3930>