

## Frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares en eritrocitos de dos especies ícticas de la laguna de Coyuca de Benítez, Gro.

JUSTO-ESTRADA, Julieta Cristal\*†, AGUIRRE-NOYOLA, José Luis, ANICA-MATA, María Nathaly, CARBAJAL-LÓPEZ, Yolanda

\*Laboratorio de Investigación en Medicina molecular.

†Laboratorio de Investigación en biotecnología y genética microbiana. Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero. Av. Lázaro Cárdenas s/n. Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Gro. México. Tel. 7441318194

Recibido Mayo 7, 2014; Aceptado Noviembre 7, 2014

### Resumen

Los ecosistemas acuáticos son de suma importancia para el desarrollo de la vida, pues proporcionan el hábitat para la fauna y flora acuática, además de que son fuente de alimento y agua. La contaminación de estos ambientes puede tener efectos negativos sobre la vida acuática por ejemplo la alteración de la reproducción de estos organismos y la disminución en las poblaciones de las especies, lo que amenaza la seguridad alimentaria y afecta directa o indirectamente a la salud humana. El rápido crecimiento poblacional aunado a un desarrollo industrial acelerado así como, a los cambios en los estilos de vida, han incrementado la presión sobre los ambientes acuáticos. La mayor preocupación se centra en la presencia de contaminantes químicos, procedentes de fuentes industriales, agrícolas y de la escorrentía urbana, especialmente los disruptores endocrinos y los genotóxicos, los primeros por tener la capacidad de alterar el sistema endocrino de los organismos y los segundos por su capacidad para interactuar con el ADN de las células; con todas las implicaciones ecológicas que esto representa (como alteraciones reproductivas y disminución de las poblaciones). Aunque se conocen las posibles fuentes de contaminación en México, la información acerca de ésta y la calidad del agua es deficiente, por un inadecuado sistema de monitoreo (Björklund et al., 2009). Los peces son comúnmente utilizados para el biomonitoreo de contaminantes en ecosistemas acuáticos, ya que son los vertebrados acuáticos que bioacumulan sustancias tóxicas, y responden con gran sensibilidad a cambios en el ambiente acuático y a bajas concentraciones de contaminantes ambientales (Hafez, 2009). Existen varios parámetros genotóxicos que pueden ser evaluados en organismos acuáticos tomando en cuenta biomarcadores citogenéticos, sin embargo, la cuantificación de aberraciones cromosómicas, el intercambio de cromátidas hermanas y la determinación de micronúcleos han sido los métodos más utilizados en organismos acuáticos debido a su relativa facilidad de determinación y sensibilidad a la exposición de sustancias genotóxicas (Van et al., 2007). Los micronúcleos (MN) son cuerpos citoplasmáticos esféricos, detectados en interfase, más pequeños y morfológicamente idénticos al núcleo celular, permitiendo evaluar la ruptura del ADN de cadena simple o doble, ADN mal reparado o sin reparar, alteraciones en las proteínas implicadas en la segregación cromosómica, en respuesta a agentes genotóxicos. Por ello consideramos que la búsqueda de bioindicadores nativos nos permite predecir y evitar los efectos de estos contaminantes sobre un determinado nivel de organización, que conducen al desequilibrio sobre otros niveles del ecosistema. En Nuestro trabajo nos centramos en la Laguna de Coyuca, de Benítez, Gro, debido a que es una fuente de ingresos económicos para la población y además es una fuente importante de alimento, no solo a nivel regional, sino también estatal.

**Frecuencia, Micronúcleos y Anomalías, Eritrocitos, Laguna de Coyuca de Benítez, Gro.**

### Abstract

Aquatic ecosystems are critical for the development of life, as they provide habitat for aquatic fauna and flora, plus they are a source of food and water. Contamination of these environments can have negative effects on aquatic life eg impaired reproduction of these organisms and the decline in populations of species, threatening food security and directly or indirectly affect human health. The rapid population growth coupled with accelerated industrial development as well as to changes in lifestyles, have increased pressure on aquatic environments. The biggest concern is the presence of chemical contaminants from industrial and agricultural sources and urban runoff, especially endocrine disruptors and genotoxic, the first to have the ability to disrupt the endocrine system of organisms and the latter by its ability to interact with DNA from the cells; with all ecological implications this represents (such as reproductive disorders and declining populations). Although potential sources of pollution in Mexico are known, the information about it and the water quality is poor, inadequate monitoring system (Björklund et al., 2009). The fish are commonly used for biomonitoring of pollutants in aquatic ecosystems because they are aquatic vertebrates that bioaccumulate toxic substances, and respond sensitively to changes in the aquatic environment and low concentrations of environmental contaminants (Hafez, 2009). There are several genotoxic parameters that can be evaluated in aquatic organisms considering biomarkers cytogenetic, however, quantification of chromosomal aberrations, the sister chromatid exchanges and micronuclei have been the most used in aquatic organisms methods due to its relative ease determination and sensitivity to exposure to genotoxic substances (Van et al., 2007). Micronuclei (MN) are cytoplasmic spherical bodies, interphase detected, smaller and morphologically identical to the cell nucleus, allowing assessing DNA breakage of single or double stranded, DNA poorly repaired or unrepaired, alterations in the proteins involved in chromosome segregation in response to genotoxic agents. We therefore consider that the pursuit of native biomarkers allows us to predict and avoid the effects of these pollutants on a certain level of organization, which lead to imbalance on other levels of the ecosystem. In our work we focus on the Laguna de Coyuca, Benítez, Gro, because it is a source of income for the population and is also an important food source, not only regionally but also the state.

**Frequency, Micronuclei and abnormalities, erythrocytes, Laguna Coyuca de Benítez, Gro.**

**Citación:** JUSTO-ESTRADA, Julieta Cristal, AGUIRRE-NOYOLA, José Luis, ANICA-MATA, María Nathaly, CARBAJAL-LÓPEZ, Yolanda. Frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares en eritrocitos de dos especies ícticas de la laguna de Coyuca de Benítez, Gro. Foro de Estudios sobre Guerrero. Mayo 2014 – Abril 2015, 1-2:310-314

\* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: cristal\_juli97@hotmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

## Introducción

Los ecosistemas acuáticos son de suma importancia para el desarrollo de la vida, pues proporcionan el hábitat para la fauna y flora acuática, además de que son fuente de alimento y agua. La contaminación de estos ambientes puede tener efectos negativos sobre la vida acuática por ejemplo la alteración de la reproducción de estos organismos y la disminución en las poblaciones de las especies, lo que amenaza la seguridad alimentaria y afecta directa o indirectamente a la salud humana. El rápido crecimiento poblacional aunado a un desarrollo industrial acelerado así como, a los cambios en los estilos de vida, han incrementado la presión sobre los ambientes acuáticos.

La mayor preocupación se centra en la presencia de contaminantes químicos, procedentes de fuentes industriales, agrícolas y de la escorrentía urbana, especialmente los disruptores endocrinos y los genotóxicos, los primeros por tener la capacidad de alterar el sistema endocrino de los organismos y los segundos por su capacidad para interactuar con el ADN de las células; con todas las implicaciones ecológicas que esto representa (como alteraciones reproductivas y disminución de las poblaciones). Aunque se conocen las posibles fuentes de contaminación en México, la información acerca de ésta y la calidad del agua es deficiente, por un inadecuado sistema de monitoreo (Björklund *et al.*, 2009). Los peces son comúnmente utilizados para el biomonitoreo de contaminantes en ecosistemas acuáticos, ya que son los vertebrados acuáticos que bioacumulan sustancias tóxicas, y responden con gran sensibilidad a cambios en el ambiente acuático y a bajas concentraciones de contaminantes ambientales (Hafez, 2009).

Existen varios parámetros genotóxicos que pueden ser evaluados en organismos acuáticos tomando en cuenta biomarcadores citogenéticos, sin embargo, la cuantificación de aberraciones cromosómicas, el intercambio de cromátidas hermanas y la determinación de micronúcleos han sido los métodos más utilizados en organismos acuáticos debido a su relativa facilidad de determinación y sensibilidad a la exposición de sustancias genotóxicas (Van *et al.*, 2007).

Los micronúcleos (MN) son cuerpos citoplasmáticos esféricos, detectados en interfase, más pequeños y morfológicamente idénticos al núcleo celular, permitiendo evaluar •la ruptura del ADN de cadena simple o doble, ADN mal reparado o sin reparar, alteraciones en las proteínas implicadas en la segregación cromosómica, en respuesta a agentes genotóxicos.

Por ello consideramos que la búsqueda de bioindicadores nativos nos permite predecir y evitar los efectos de estos contaminantes sobre un determinado nivel de organización, que conducen al desequilibrio sobre otros niveles del ecosistema. En Nuestro trabajo nos centramos en la Laguna de Coyuca, de Benítez., Gro, debido a que es una fuente de ingresos económicos para la población y además es una fuente importante de alimento, no solo a nivel regional, sino también estatal.

## Objetivos

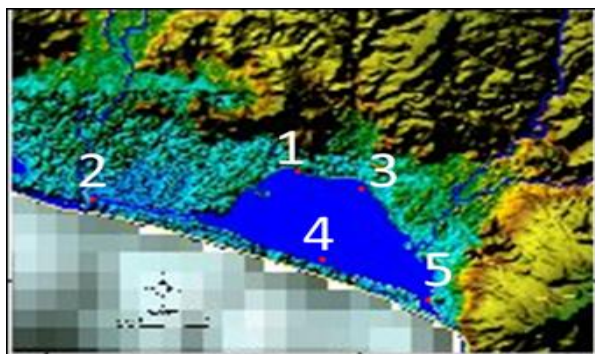
- Evidenciar la respuesta de la exposición a contaminantes genotóxicos mediante la formación de micronúcleos y otras anomalías nucleares en eritrocitos de *Oreochromis niloticus* (tilapia) y *Galeichthys caeruleus* (bagre).

- Proponer cuál de las especies en estudio es un adecuado marcador biológico para el monitoreo de contaminantes genotóxicos en ambientes acuáticos

## Metodología

### Zona de muestreo:

La laguna de Coyuca de Benítez pertenece a un sistema costero que comprende a tres cuerpos de agua: Mitla-Chautengo, Coyuca, con una extensión de 10.5 km de longitud y 4.5 km en su parte más ancha, en su porción occidental recibe aportes del río Coyuca. Se seleccionaron 5 puntos de muestreo para la obtención de los especímenes de estudio (Figura 1 y Cuadro 1).



**Figura 1** Laguna de Coyuca de Benítez, Gro, en donde se señalan los cinco puntos de monitoreo (puntos rojos). 1) Zona de manglar 2) Canal de la laguna 3) Embarcadero 4) Islas de las aves 5) Luces en el mar. Cortesía de CCA-UNAM

No. Sitio	Abreviatura	Ubicación	Coordenadas	
			Latitud	Longitud
1	DRC	Desembocadura del Río de Coyuca	16°57'01.68"	100°06'50.36"
2	LM	Luces del Mar	16°55'33.73"	100°01'02.73"
3	ZTP	Zona turística Pie de la Cuesta	16°54'07.32"	99°58'10.42"
4	EE	El Embarcadero	16°57'40.08"	100°00'05.95"
5	IA	Isla de las aves	16°57'37.42"	100°02'20.15"

**Cuadro 1** Coordenadas de los cinco sitios de la Laguna de Coyuca de Benítez

### Selección de peces:

Las muestras se recolectaron de 5 sitios de la laguna de Coyuca de Benítez Gro, y se procesaron 15 peces de cada especie (*Oreochromis niloticus* y *Galeichthys caerulescens*) por sitio. Además el grupo control se tomó de especies en cautiverio, que viven en condiciones adecuadas como son: un pH de 8.2, demanda de oxígeno 9 mg/L, temperatura de 28°C; los peces eran alimentados con levadura con carbohidratos y los estanques median 150 cm de profundidad con una superficie del 200 m<sup>2</sup>.

### Técnica de micronúcleos (MN):

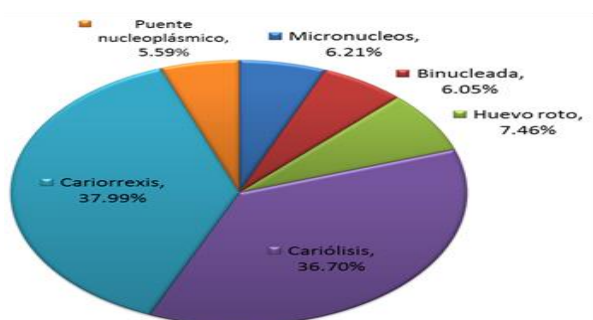
La prueba de MN se realizó siguiendo la metodología de Schmid (1975) con ligeras modificaciones. Una gota de sangre se obtuvo con el corte de la cola y fue colocada sobre un portaobjetos previamente etiquetado, se realizó un extendido y se dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente se fijó con metanol durante 5 minutos, e inmediatamente después se tiñó con Giemsa por 40 minutos. Las laminillas se lavaron con agua corriente cuidando de que no le cayera agua directamente y se llevaron al microscopio. Se utilizó un microscopio óptico Zeiss Axiophot-Axiolab con objetivo de 100 X de inmersión en aceite y se contabilizaron un total de 3,000 células por pez. En campo se realizó el frotis de la sangre de los peces y posteriormente en el laboratorio se continuó con el resto del análisis.

### Análisis de micronúcleos.

Se contabilizaron un total de 3,000 células por pez. Los MN fueron identificados según los criterios sugeridos por Schmid (1975) y Fenech (2000), mientras que para las AN se siguieron las clasificaciones realizadas por diferentes autores.

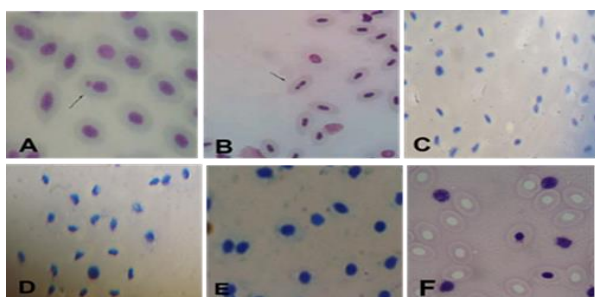
## Resultados

Del total de células analizadas (3000 por pez), solo se presentaron anomalías en el 1.15% de los casos, a su vez fue más frecuente cariorexis, seguido de cariólisis, huevo roto, micronúcleos, células binucleadas y menormente puente nucleoplásmico con los siguientes porcentajes (Fig. 2 y 3)

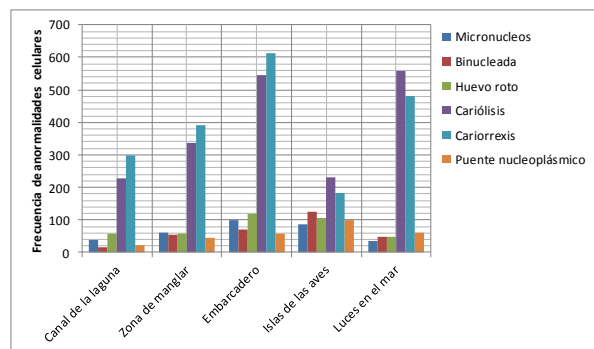


**Figura 2** Total de anomalías encontradas en el estudio.

De las cinco zonas de análisis se reveló que la que presentaba mayor número de afectación en las células de las especies de estudio fue la zona del embarcadero seguida de Luces en el Mar, Zona del Manglar, Canal de la laguna y la Isla de las Aves (Fig. 5).



**Figura 3.** Ejemplo representativo de Micronúcleos y anomalías nucleares en eritrocitos de sangre periférica de *G. caeruleus* y *Oreochromis niloticus*. A, C) células con micronúcleo, B, D) células con cariólisis y F) célula con puente nucleoplásmico



**Figura 4** Anomalías encontradas en cada zona de muestreo.

## Discusión y conclusión

En todos los sitios de muestreo y en ambas especies se presentaron anomalías lo cual sugiere la presencia de agentes genotóxicos y otros contaminantes en el agua. Por otra parte la principal anomalía presentada fue la cariorexis y cariólisis, probablemente porque ambos procesos están involucrados en la necrosis, que puede ser causada por agentes genotóxicos, sino también por privación de oxígeno, agentes físicos, reacciones inmunológicas, agentes infecciosos e incluso la desnutrición. El conteo general de micronúcleos en todos los sitios estudiados muestran una frecuencia muy baja, la explicación podría deberse porque ciertas especies de peces pueden desarrollar una cinética de eliminación de células o el desarrollo de mecanismos adaptativos de tolerancia a estrés químico. De manera general, las diferencias preliminares de anomalías entre las especies utilizadas en este estudio, sumado a la facilidad de captura, hábitos alimenticios y a la gran diversidad de hábitats que esta especie presenta en el mundo, convierten a *Oreochromis niloticus* en una especie "centinela" y posible biomonitor de agentes xenobióticos.

## Referencias

Björklund, G., Burke, J., Foster, S., Rast, W., Vallée, D., y Van Der Hoek, W. (2009). Chapter 8 Impacts of water use on water systems and the environment. En P. M. Hidricos, *Informe sobre el Desarrollo de los recursos hídricos en el mundo* (págs. 127-149). Bolognesi, C., y Hayashi, M. (2011). Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 205-213.

Fenech M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455, 81 – 95.

Hafez, A.M. (2009). Mugil cephalus Genome: A Sensitive Monitor for Genotoxicity and Cytotoxicity in Aquatic Environment. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences, III* (3), 2176-2187.

Schmid W. (1975). The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31, 9-15.

Van Ngan, P., Gomes, B., Passos, M.J., Ussami, K.A., Campos, D., Rocha, A., y Pereira, B. (2007). Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station “Comandante Ferraz”, King George Island. *Polar Biol*, 30:209-217.