

EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN DE CÉLULAS SANGUÍNEAS DE PECES DE LA LAGUNA DE YURIRIA A TRAVÉS DEL ENSAYO COMETA

Ugalde González Karla Estefanía (1), Mares Parra Ana Guadalupe (2), Dra. González Millé Donají Josefina (3) Dr. Costilla Salazar Rogelio (4), Dra. Rocha Amador Diana Olivia (5)

1 [Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | [ke.ugaldegonzalez@ugto.mx]

2 [Licenciatura en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato] | [anamissfly@hotmail.com]

3 [CIACyT - Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí] | [nanacatl_gm@hotmail.com]

4 [Departamento de Ciencias Ambientales, División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [roy1379@hotmail.com]

5 [Departamento de Farmacia, División Ciencias de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [drochaa@ugto.mx]

Resumen

La laguna de Yuriria es un cuerpo de agua localizado en el municipio de Yuriria Guanajuato, México, la cual ha sido impactada por varios años con aguas residuales y agroquímicos provenientes de zonas urbanas y agrícolas aledañas, lo cual ha dado lugar al crecimiento de maleza. En el presente trabajo se evaluó la integridad del ADN en organismos acuáticos de la laguna de Yuriria a través del ensayo cometa. Se evaluarán dos tipos de carpas recolectadas de dos zonas de la laguna, la Isla y la Angostura, así como de una granja de peces. Las carpas de la zona de la Angostura presentan menor tamaño en el núcleo celular y mayor daño al ADN en los parámetros del ensayo cometa (momento y longitud de la cola) lo cual puede estar relacionado a la situación de estrés por falta de oxígeno debido a las condiciones de la zona y a la presencia de químicos en el cuerpo de agua.

Abstract

The lake of Yuriria is a body of water located in the municipality of Yuriria Guanajuato, Mexico, which has been impacted for several years with wastewater and agrochemicals, from urban and agricultural areas nearby which has given rise to the growth of aquatic weeds. In the present work, the integrity of the DNA in aquatic organisms of the Yuriria lake was evaluated through the comet assay. Two types of carp were collected from two areas of the lake, the island and the Angostura, as well as a fish farm. The tents of the Angostura area have a smaller cell nucleus size and greater DNA damage in the parameters of the comet assay (olive tail moment and length of the tail), which may be related to the stress situation due to lack of oxygen due to the conditions of the area and the presence of chemicals in the body of water.

PALABRAS CLAVE

1; Ecotoxicología 2; Biota acuática 3; Lirio acuático 4; Genotoxicidad 5 Riesgo

INTRODUCCIÓN

La laguna de Yuriria – nombrada área natural protegida en 2001 y sitio Ramsar en 2004 – se ubica en la región hidrológica de la cuenca Lerma-Chapala. Las principales actividades de la zona son la agricultura mixta, la ganadería extensiva y la pesca, con cooperativas legalmente establecidas y más de 300 pescadores libres. **[1]** La laguna recibe las descargas con alto contenido de nutrientes, plaguicidas (aplicados en cantidades superiores a las recomendadas) proveniente de los municipios de Moroleón, Uriangato y Yuriria, así como del río Lerma, y de zonas agrícolas de la Ciénega y sus alrededores. **[2]** Estas descargas permiten la presencia de diversos plaguicidas (paratión metílico, clorpirifos, dimetoato, metamidofos, cipermetrina, glifosato, forato, carbofurán, diazinón, endosulfán, malatión y pirimicarb, entre otros). **[3]** Además, la descarga de nutrientes ocasiona la proliferación del lirio acuático que actualmente está siendo controlado con la aplicación del herbicida glifosato por aspersión. Estos plaguicidas pueden ocasionar impactos en el ecosistema de la laguna.

Actualmente la vigilancia de agentes contaminantes del ambiente se estudia con dos propósitos: evaluar el riesgo al que se exponen los ecosistemas que habitan en dicho medio y la evaluación de riesgo en humanos. Esta vigilancia se puede realizar utilizando biomarcadores de efecto en organismos centinelas, tal es el caso del ensayo cometa, la cual es una metodología sensible; simple, rápida, económica que se utiliza para medir rupturas de cadenas de ADN y sitios lábiles a álcali a nivel de células individuales **[4]**

Los organismos acuáticos presentes en la laguna de Yuriria pueden presentar daños en su organismo por la disminución de oxígeno debido al crecimiento excesivo del lirio acuático, a una elevada concentración de materia orgánica, además se sabe que pudieran estar expuestos a agroquímicos debido a las actividades de agricultura de la zona, por lo que el objetivo general del proyecto fue evaluar la integridad del ADN de peces de la laguna de Yuriria a través del ensayo cometa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio: La laguna de Yuriria, se encuentra localizada en el municipio de Yuriria, Guanajuato, México. Se sitúa a una altitud de 1750 m y ocupa una superficie de 97 km² con una profundidad media de 2.6 m y una capacidad de 325 millones de m³.

Especie seleccionada: En la laguna de Yuriria se encuentran albergadas 7 diferentes especies de peces, en el presente proyecto se decidió trabajar con dos especies, las cuales son: *Cyprinus carpio* (Carpa común) y *Ctenopharyngodon idella* (Carpa herbívora). Las carpas son especies herbívoras que pueden pesar y medir hasta 1 a 1.8 kg y 30 a 80 cm respectivamente.

Recolección de los peces: Se trabajó con los pescadores de la laguna de Yuriria, se recolectaron 16 carpas vivas por la zona de la Angostura y 26 por la isla de la laguna, además se obtuvieron 15 peces de granja de la misma zona.

Obtención de la muestra de sangre: Las carpas vivas se colocaron en una tina oxigenada. Se pasaron a un recipiente que contenía aceite de clavo un par de minutos hasta adormecerlos. Una vez sedados, se tomó muestra de sangre de la vena central que pasa debajo de la columna vertebral. Se obtuvo al menos 1ml de sangre, la cual se colocó en tubos eppendorf los cuales contenían 15 µl de heparina.

Ensayo Cometa

Preparación de las camas: Las laminillas se limpiaron con alcohol anhidro, se agregaron 150 µl de solución de agarosa regular al 1%, se distribuyó con la punta del dedo limpio sobre la laminilla, se colocaron en charolas y se dejaron secar en el refrigerador.

Preparación de la muestra: Se mezclaron 10 µl de la muestra de sangre con 300 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 5%. Se tomaron 75µl de la dilución y se depositaron en una capa de agarosa al 6%. Se colocó un cubreobjetos formando un sándwich y se puso en un baño de hielo para gelificar.

Lisis de las células: Una vez gelificadas las muestras, estas se pasaron a un vaso coplin que contenía una solución tampón (Trisma base/NaOH/EDTA) para llevar a cabo la lisis de las células. Las muestras se refrigeraron a 4°C por 12 horas.

Electroforesis: En una cámara de electroforesis oscura, se cubrieron las laminillas con una solución buffer de EDTA/NAOH. Se dejaron reposar 5 min en el buffer para el desenrollamiento del ADN. La cámara de electroforesis se conectó a la fuente de poder a 25V, 300A durante 10 min. La solución buffer se mantuvo a 4°C durante todo el procedimiento. Las laminillas se escurrieron, se secaron y se les realizaron 2 lavados con 2ml de trisma base al 0.4M y etanol anhidro. Finalmente, se secaron y guardaron en una caja porta laminillas. La electroforesis se llevó a cabo en un cuarto oscuro.

Lectura de las células: Las laminillas se tiñeron con 15 µL de solución de bromuro de etidio al 10% y se les colocó un cubreobjetos, se observaron a 20X en un microscopio de fluorescencia. Con ayuda del software Komet v 4.0 se hizo lectura de los parámetros del ensayo cometa en 100 células. Los parámetros evaluados fueron el área de la célula, el Olive Tail Moment (Momento en español: definido como el producto de la longitud de la cola y la fracción de ADN total de la cola) y longitud de la cola.

Análisis estadístico: Para las variables continuas se realizaron pruebas descriptivas (media, desviación estándar, máximo y mínimo) así como pruebas de normalidad. Las variables de talla, tamaño de la célula y el momento fueron transformados logarítmicamente. Para las variables categóricas como género, especie, sitio de muestreo se evaluaron las frecuencias. La variable de peso se transformó en una variable categórica y se formaron grupos de 0-100g, 101-200g y mayor a 200g. Se realizó un análisis bivariado a través de la prueba t de student y correlaciones, así como un análisis multivariado con ANOVA. Para observar la diferencia entre los grupos se utilizó la prueba DMS. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 19.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se recolectaron peces de dos zonas de la laguna de Yuriria, de la Angostura (n=16) y de la isla (n=26), así como de una granja de peces cercana a la laguna (n=15). Las especies seleccionadas fueron carpa común (*Cyprinus carpio*) y carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*). En la tabla 1, se muestran características descriptivas de las poblaciones de peces con base a las diferentes zonas de recolección, se observa que la talla fue menor en las carpas recolectadas de la isla (19.7 ± 1.2) en relación con la Angostura (27 ± 1.2) y la granja (23.7 ± 1.0), en función de la variable de sexo, se observa que predominan los machos, en la Angostura (75%), la isla (88.5%), y la granja (86.7%). En cuanto al peso, se observa que en la isla predominan las carpas con pesos entre 101-200g, mientras que en la Angostura y la granja predominan las carpas con pesos mayores a 200g.

Tabla 1: Características descriptivas de los individuos estudiados carpa común (*Cyprinus carpio*) y carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*).

Variable	Isla	Angostura	Granja	Total
Número de individuos	26	16	15	57
	$\bar{x} \pm DE^a$ (Min-Max)			
Talla	19.7 ± 1.2 (17 - 24)	27 ± 1.2 (18 - 33)	23.7 ± 1.0 (20 - 27)	19.3 ± 1.7 (17 - 24)
Sexo	n (%)			
Hembras	3(11.5)	4(25)	2(13.3)	9(12)
Machos	23(88.5)	12(75)	13(86.7)	66(88)
Peso	n (%)			
0 - 100 g	8 (30.8)	-	-	8(14)
101-200g	18 (69.2)	7(43.8)	4(26.7)	29(50.9)
>200g	-	9(56.3)	11(73.3)	20(35)

^a media geométrica \pm desviación estándar (mínimo - máximo);

Con respecto al ensayo cometa, los resultados se presentan en la tabla 2. Al comparar los resultados de las tres zonas de recolección, en la tabla 2 se puede observar que el área de la célula es mayor en las carpas obtenidas de la granja (183.4 ± 1.1) en relación con los de la isla (86.7 ± 1.5) y la Angostura (57.1 ± 1.6) ($p=0.000$). El momento fue mayor en las carpas de la Angostura (1.1 ± 2.2) y la isla (0.7 ± 1.2) en comparación con las carpas de la granja (0.3 ± 1.3) ($p=0.000$), lo mismo pasa con el largo de la cola, el mayor tamaño lo presentan los peces de la Angostura (3 ± 0.9), en comparación con los de la isla (2.5 ± 0.5) y la granja (0.9 ± 0.3), sin embargo en este parámetro se observó una diferencia entre los tres grupos ($p=0.000$). No se observaron diferencias en los parámetros del ensayo cometa con respecto a la talla, el sexo y el peso ($p>0.05$; Datos no presentados en el documento).

Tabla 2: Parámetros evaluados del ensayo cometa.

VARIABLE	ISLA	ANGOSTURA	GRANJA	VALOR P [§]
Número de individuos	26	16	15	
	$\bar{x} \pm DE$ (Min-Max)			
Área de célula*	86.7 ± 1.5^a (37.1 – 213.8)	57.1 ± 1.6^a (26.3 – 123)	183.4 ± 1.1^a (147.9 – 229)	0.00
Momento*	0.7 ± 1.2 (0.46 – 1.3)	1.1 ± 2.2 (0.263 – 3.46)	0.3 ± 1.3^b (0.148 – 0.5)	0.00
Longitud de cola**	2.5 ± 0.5^a (1.6 – 3.9)	3 ± 0.9^a (0.95 – 4.04)	0.9 ± 0.3^a (0.421 – 1.5)	0.00

*media geométrica \pm desviación estándar (mínimo – máximo); **media aritmética \pm desviación estándar (mínimo – máximo); §Anova; a Los tres grupos fueron diferentes. b diferente de Isla y angostura; Las diferencias entre grupos se evaluaron con la prueba DMS.

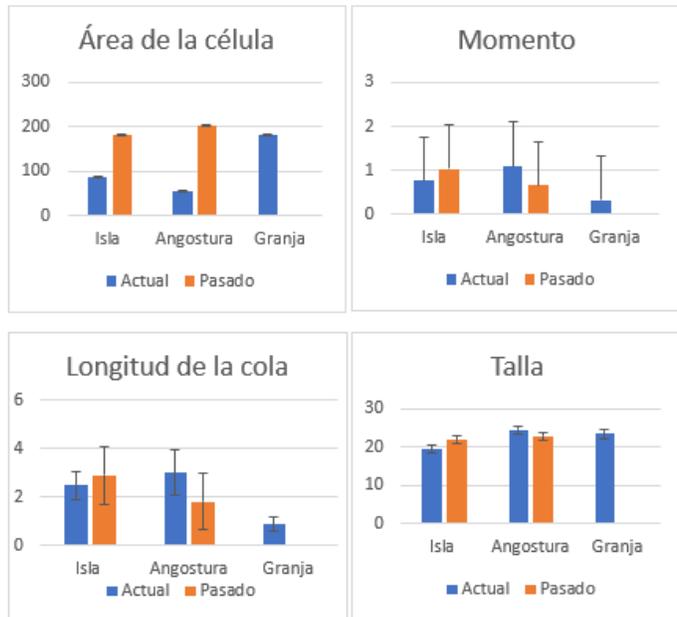


Imagen 1: Comparación de los parámetros evaluados del ensayo cometa con un muestreo previo, realizado en 2017

La imagen 1, compara los resultados obtenidos con uno previo realizado en el 2017 en el mismo sitio por nuestro grupo de trabajo. Se observa que el área de la célula fue mucho mayor en el muestreo previo tanto en la Angostura como en la isla. El cuanto al momento se observa que en la isla los valores fueron mayores en el muestreo del 2017 y en la Angostura los valores fueron mayores en el 2018. En comparación a la granja, los valores de este parámetro fueron mayores en los peces de la laguna para ambos años. La longitud de la cola se comporta de la misma manera que el momento. Mayor en la isla en el 2017 y mayor en la Angostura en el 2018. Las tallas de los peces fueron similares en el 2017 y en el 2018 así como los de la granja.

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran alteraciones en la integridad del ADN en los peces de la laguna en comparación con los de la granja. Lo que puede ser debido a la presencia de sustancias químicas presentes en la laguna. En el 2018, los peces de la zona de la Angostura presentaron mayor alteración evaluada a través del momento y longitud de la cola del ensayo cometa. En esta misma zona el tamaño del núcleo celular fue de menor tamaño lo cual podría estar relacionado con un estrés hipóxico, ocasionado por la abundancia del lirio en el fondo de la laguna ya que desde el 2017 se están llevando acciones para su erradicación. El ensayo cometa funcionó como un buen biomarcador de efecto para organismos acuáticos de la laguna de Yuriria. A través de estos monitoreos se puede dar seguimiento a la salud ecosistémica de cuerpos de agua, lo cual apoya a las medidas de control y prevención de contaminación y de la maleza acuática llevadas a cabo en la laguna.

AGRADECIMIENTOS

A todos los involucrados durante el desarrollo del presente proyecto, a la Universidad de Guanajuato, a la coordinadora de los programas institucionales DAIP, y al CIACYT- UASLP por permitirnos trabajar dentro de sus instalaciones.

REFERENCIAS

- [1] Espinal Carreón T, Sedeño Díaz JE, López López E (2013). Evaluación de la calidad del agua en la Laguna de Yuriria, Guanajuato, México, mediante técnicas multivariadas: un análisis de valoración para dos épocas 2005, 2009-2010. *Rev. Int. Contam. Ambient* vol.29 no.3
- [2] Ramos Ventura L, Novelo Retana A (1993). Vegetación y flora acuáticas de la laguna de Yuriria, Guanajuato, México. *Acta Botánica Mexicana*, núm. 25, pp. 61 – 79
- [3] Bejarano González F (2017). Plaguicidas altamente peligrosos utilizados en el Bajío de Guanajuato. *Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México, A. C. (RAPAM)*, pp221- 248. Disponible en: <https://rap-al.org/la-red-de-accion-sobre-plaguicidas-y-sus-alternativas-de-mexico-rapam-presenta-el-libro-los-plaguicidas-altamente-peligrosos-en-mexico/>. Última vez accedido 25 de julio del 2018
- [4] Ansoar Rodríguez Y, Fontanetti C, Christofolletti C, Díaz-Llera S (2015). Aplicaciones del Ensayo Cometa en Genética Ecotoxicológica. *Revista Cenic, Ciencias Biológicas* volumen 46, No. 1, pp. 51-62.