



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
COORDINACIÓN DE POSTGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA

GENOTOXICIDAD EN CÉLULAS SANGUÍNEAS DE LA
GUARAGUARA *Ancistrus brevifilis* (EIGENMANN, 1920), BAJO
CONDICIONES CONTROLADAS Y EN CONDICIONES NATURALES EN
DOS LOCALIDADES DEL RÍO MANZANARES, ESTADO SUCRE,
VENEZUELA.
(Modalidad: Investigación)

Lcda. CAROL YOVANA LÁREZ LÓPEZ

TABRAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL TÍTULO DE *MAGISTER SCIENTIARUM* EN BIOLOGÍA
APLICADA MENCIÓN ECOTOXICOLOGÍA

CUMANÁ, ABRIL DE 2011

GENOTOXICIDAD EN CÉLULAS SANGUÍNEAS DE LA
GUARAGUARA *Ancistrus brevifilis* (EIGENMANN, 1920), BAJO
CONDICIONES CONTROLADAS Y EN CONDICIONES NATURALES EN
DOS LOCALIDADES DEL RÍO MANZANARES, ESTADO SUCRE,
VENEZUELA.

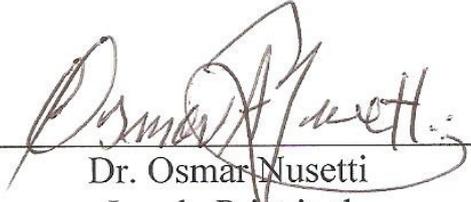
APROBADO POR:



Dra. Carmen Alfonsi
Asesor



MSc. Leida Marcano
Jurado Principal



Dr. Osmar Nusetti
Jurado Principal

INDICE

<u>DEDICATORIA.....</u>	<u>i</u>
<u>AGRADECIMIENTOS.....</u>	<u>ii</u>
<u>LISTA DE FIGURAS.....</u>	<u>iii</u>
<u>RESUMEN.....</u>	<u>iv</u>
<u>INTRODUCCIÓN.....</u>	<u>1</u>
<u>MATERIALES Y MÉTODOS.....</u>	<u>7</u>
<u>Área de estudio.....</u>	<u>7</u>
<u>Captura de los organismos.....</u>	<u>7</u>
<u>Bioensayos.....</u>	<u>8</u>
<u>Bioensayo de toxicidad aguda con glifosato:</u>	<u>8</u>
<u>Bioensayo de toxicidad crónica con sedimentos:.....</u>	<u>8</u>
<u>Detección in situ:.....</u>	<u>9</u>
<u>Extracción de las muestras de sangre:.....</u>	<u>9</u>
<u>Viabilidad Celular:.....</u>	<u>9</u>
<u>Detección de daños a nivel de ADN.....</u>	<u>10</u>
<u>Ensayo de micronúcleos:.....</u>	<u>10</u>
<u>Ensayo cometa:.....</u>	<u>11</u>
<u>Métodos estadísticos:.....</u>	<u>12</u>
<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</u>	<u>13</u>
<u>Bioensayo de toxicidad aguda con glifosato:.....</u>	<u>13</u>
<u>Bioensayo de toxicidad crónica con sedimentos:.....</u>	<u>17</u>
<u>Detección in situ:.....</u>	<u>23</u>
<u>CONCLUSIONES.....</u>	<u>28</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA.....</u>	<u>29</u>
<u>ANEXOS.....</u>	<u>41</u>
<u>HOJA DE METADATOS.....</u>	<u>45</u>

DEDICATORIA

A mi persona

AGRADECIMIENTOS

¡Aja..! Feliz de escribir una vez más pensando en ustedes..!

Agradezco en principio al Padre Creador del Universo y a mis Guías y Protectores por no abandonarme... aún en momentos difíciles...

A mi familia por supuesto, por creer siempre en mi y por hacer de mi lo que hoy soy.! Gracias papá, mamá, Yndira, Carlos Nicola. A mis pequeñitos Diego y Carlos Sebastián que me inundan cada día con sus sonrisas y ocurrencias. A mis familiares todos, por el cariño, la confianza y la fraternidad.

A mi asesora la Dra. Carmen Alfonsi, por brindarme una oportunidad más para el crecimiento profesional. Gran amiga a lo largo de todo este tiempo y sé que mas allá también, gracias por el incentivo constante, el apoyo incondicional, la crítica y el consejo oportuno..

Al Dr. Julio Pérez por sus acertados comentarios.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Sinatra, José Antonio, José Gregorio y Bladimir por su disposición al trabajo en equipo, por las conversaciones ociosas, por el buen reír..!

Al personal que labora en el Postgrado de Biología Aplicada; especialmente a la Sra. Luz Coronado por toda la colaboración dada a lo largo de mi estancia allí.

Al personal del Departamento de Oceanografía Química: Ivis Fermín, Edymir Parra y Germán Rodríguez por la asistencia prestada en el análisis de metales pesados e hidrocarburos en sedimentos.

A mis amigas de siempre Roseulis, Elena, Carmen Adriana, Mariana e Ydelys, que hemos transitado esta vía en busca de algo más allá en la ciencia y de mejoras para el porvenir.

Al FONACIT por el financiamiento otorgado para la realización de esta maestría, a través de la Misión Ciencias.

A todas aquellas personas que quizás hoy no están.. pero que no por eso dejan de ser menos importantes...

A todos aquellos que quizás no nombré.. A todos, muchísimas gracias!!!

LISTA DE FIGURAS

RESUMEN

La especie *Ancistrus brevifilis* (Siluriformes: Loricariidae) conocida localmente como guaraguara, es un pez ampliamente distribuido en los ecosistemas dulceacuícolas de la región nororiental de Venezuela. Esta especie habita y se alimenta en el fondo de los ríos donde se acumula gran cantidad de contaminantes; por lo tanto, se usó como organismo centinela de contaminación acuática. Se evaluó el efecto genotóxico que sobre las células sanguíneas de *A. brevifilis* tienen los contaminantes provenientes de la actividad agrícola presentes en el río Manzanares, a través de: un ensayo de toxicidad aguda con dosis subletales de glifosato (0; 1; 3 y 5 ppm), un ensayo de toxicidad crónica por exposición a sedimentos y por detección *in situ* en el campo en las localidades de Yoraco y Guasdua. Se determinó la viabilidad celular y se estimaron las lesiones a nivel de ADN a través de las técnicas de micronúcleos y ensayo cometa. El promedio del porcentaje de células viables estuvo en un rango comprendido desde 88,67 hasta 91,96%. En el ensayo de toxicidad aguda con la dosis más alta utilizada de glifosato se encontró la mayor cantidad de células micronucleadas (K-W=12,64; $p<0,01$) y aberraciones nucleares (K-W=8,30 $p<0,05$); en la genotoxicidad evaluada por el ensayo cometa, se hallaron diferencias altamente significativas por tipo de cometa y longitud de la cola del mismo (K-W=42,60; $p<0,001$ y K-W=42,56; $p<0,001$) respecto al grupo control. En cuanto al ensayo de toxicidad crónica con sedimentos, los micronúcleos resultaron significativos por tiempo de exposición (K-W=8,18; $p<0,01$); mientras que, las alteraciones nucleares fueron significativas tanto para tiempo de exposición como para el tipo de sedimentos (K-W=8,47; $p<0,01$ y K-W=13,18; $p<0,01$); por su parte se registraron también diferencias significativas en el ensayo cometa para los factores tiempo de exposición (K-W=18,42; $p<0,001$) y tipo de sedimentos (K-W=20,16; $p<0,001$). En la detección *in situ* se encontraron diferencias significativas entre los promedios de micronúcleos (K-S=1,58; $p<0,05$), tipo de cometa (K-S=9,22; $p<0,001$) y longitud de la cola de los mismos (K-S=9,22; $p<0,001$) para las localidades de Yoraco y Guasdua. Si bien, el glifosato tiene una actividad biológica de corta duración en suelos y agua, no se biomagnifica ni se mueve a lo largo de la cadena alimenticia, y no se filtra a las aguas subterráneas desde el suelo; estos resultados demuestran efectos adversos en la especie *A. brevifilis*. En los ensayos de

laboratorio, los sedimentos del río Manzanares causaron daños en el ADN del organismo en estudio dependiente del tiempo de exposición; como es el caso, de micronúcleos y cometas; mientras que, en la detección *in situ* los daños encontrados en el material genético de la guaraguara fueron mínimos, comparados con los resultados obtenidos en el laboratorio, a pesar de las diferencias halladas entre las localidades de Yoraco y Guasdua. La sensibilidad del ensayo cometa y test de micronúcleos varió con las condiciones de experimentación.

INTRODUCCIÓN

Los ríos son los principales vehículos de transporte de constituyentes químicos debido a la acción humana. La biodisponibilidad de estos contaminantes puede estar asociada a su distribución en el sedimento, a partículas suspendidas en la columna de agua y a otros factores fisicoquímicos y bióticos que afectan la bioacumulación y su toxicidad (Sadiq, 1992; Geffard *et al.*, 2002). Son muchos los contaminantes de importancia ecotoxicológica, que son vertidos al medio acuático entre ellos se incluyen: hidrocarburos aromáticos, productos organoclorados (DDT, dieldrin), clorofenoles, bifenilos policlorados, hexaclorohexano, dibenzo-p-dioxinas, dibenzofurano, compuestos nitroaromáticos, aromáticos heteroatómicos, fertilizantes organofosforilados y metales pesados (Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Zn, Pb, Ar) (Chen y White, 2004; Bringolf *et al.*, 2007; Kilemade *et al.*, 2009; Saleh, 2010).

El río Manzanares, importante cuerpo de agua de la región nororiental de Venezuela, nace en la serranía del Turimiquire ubicada en el sistema montañoso oriental de la cordillera de la costa. Su vertiente está situada a 2300 m sobre el nivel del mar y desemboca en el mar Caribe, a la entrada del golfo de Cariaco después de atravesar la ciudad de Cumaná; ejerciendo una gran influencia hacia el lado oeste de la costa del golfo. Se encuentra ubicado entre las coordenadas 10°24' y 10°30' N y 64°10' y 64°20' O. La profundidad máxima de este cuerpo de agua está calculada en 4 m, aproximadamente, y su recorrido total se estima en 130 km (Aguilera y Carvajal, 1976; Martínez *et al.*, 2005).

La cuenca del río Manzanares representa el principal reservorio hidrológico para la zona nororiental, con una gran importancia económica y ecológica. En su entorno se desarrollan diversas actividades de agricultura, pesca, recreación y a lo largo de sus márgenes alberga centros poblados. Como consecuencia de esto, recibe la descarga de elementos contaminantes productos de origen antropogénico, principalmente pesticidas, herbicidas y restos de fertilizantes, producto de la actividad agrícola desarrollada en sus cuencas alta y media; además de metales pesados e hidrocarburos generados por la actividad de asentamientos humanos ubicados a lo largo de sus márgenes (Senior *et al.*, 2004; Ruíz *et al.*, 2005).

La presencia de agentes tóxicos en ambientes dulceacuícolas sumados a los cambios ambientales son factores causantes del estrés celular, el cual se manifiesta en la mortalidad de los individuos, mutaciones y pérdida de la diversidad genética de las poblaciones (Sotil *et al.*, 2007). Los peces son utilizados como modelos genéticos provechosos en el estudio de contaminantes con potencial mutagénico y carcinogénico presentes en los ecosistemas acuáticos, puesto que, estos organismos son capaces de metabolizar, concentrar y almacenar los xenobióticos, permitiendo determinar su distribución y efecto (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Matsumoto y Cólus, 2000; Ali *et al.*, 2008).

La diversidad íctica del río Manzanares fue estudiada por Ruíz *et al.* (2005) quienes señalaron que los loricaridos son la segunda familia con mayor representación para este sistema hidrográfico y es *Ancistrus brevifilis* (Eigenmann, 1920), perteneciente al orden Siluriformes, familia Loricariidae (Aguilera y Carvajal, 1976; Palencia, 1995), la cuarta especie de mayor importancia de acuerdo a su abundancia relativa. Localmente conocida como guaraguara, es un pez autóctono ampliamente distribuido en los ecosistemas dulceacuíferos de la región nororiental de Venezuela, que habita y se alimenta en el fondo de los ríos donde se acumula gran cantidad de contaminantes, de allí que esta especie sea considerada como organismo centinela (Lárez, 2007).

La necesidad de evaluar y detectar el impacto de las actividades antrópicas sobre los organismos y su ecosistema, ha propiciado el uso de biomarcadores, respuestas cuantificables a distintos niveles de organización biológica que dan una medida de la exposición y en ciertos casos, de los efectos de uno o más contaminantes químicos. (Di Giulio *et al.*, 1995; Silbergeld, 1998; Palma, 2005). En este sentido, el uso de marcadores biológicos medidos a nivel molecular y celular son importantes como herramientas sensibles o “alertas temprana” en la evaluación de riesgos ecológicos por contaminantes químicos. Dada la importancia fisiológica y de supervivencia que representa el material genético, hoy en día, investigaciones están dedicadas al desarrollo, validación y aplicación de biomarcadores para evaluar la

exposición a agentes que puedan dañar la molécula de ADN (Xu *et al.*, 1999; Cajaraville *et al.*, 2000; Sarkar *et al.*, 2006).

El ADN es una molécula orgánica compleja y frágil, de estabilidad química finita, no solo sufre lesiones espontáneas, como la pérdida de bases, sino que también se ve afectado por sustancias químicas naturales y artificiales; así como por la radiación; por lo que, son inevitables los errores de la duplicación y el daño del material genético por causas del medio ambiente. Como consecuencias, el ADN sufre cambios permanentes que pueden alterar la secuencia codificadora de un gen o sus secuencias reguladoras; cuyo efecto por lo general se manifiesta en la progenie de la célula en la que se produjo la alteración de la secuencia. Adicionalmente algunas alteraciones químicas del ADN impiden su uso como plantilla para la duplicación y transcripción, pudiendo tener efectos inmediatos sobre la función y la supervivencia celular (Watson *et al.*, 2006).

En estudios de monitoreo de la contaminación en ambientes acuáticos, para la detección de respuestas tempranas al estrés de forma previa a la ocurrencia de cambios en la dinámica poblacional; se han venido utilizando varias técnicas citogenéticas y moleculares en la evaluación de genotoxicidad en los organismos (Sotil *et al.*, 2007). Para la detección de daños en el ADN se han descrito varios métodos, entre ellos: el ensayo de micronúcleos (Schmid, 1975), la prueba de intercambio de cromátidas hermanas (Latt y Allen, 1977), el ensayo cometa (Singh *et al.*, 1988) y el micrométodo (Bihari *et al.*, 2002).

El test de micronúcleos y el ensayo cometa son técnicas ampliamente utilizadas para la evaluación de microlesiones en el material genético. Estos ensayos presentan ventajas respecto a los métodos citogenéticos por su alta sensibilidad, posibilidad de evaluarse en células que no se encuentran en división, no requieren del conocimiento detallado del cariotipo, son de bajo costo, así como también fáciles y rápidos de realizar (Dixon y Wilson, 2000; Zalacaín *et al.*, 2005; Chaudhary *et al.*, 2006). Aunado a esto, estas pruebas son consideradas como herramientas útiles y altamente sensibles en estudios ecotoxicológicos y en estudios *in vivo* e *in situ*

también, para medir efectos genotóxicos en organismos que viven en ambientes acuáticos contaminados (Mitchelmore y Chipman, 1998; Ulupinar y Okumus, 2002; Lee y Steinert, 2003; Zhu *et al.*, 2005).

Existen muchos ejemplos en los cuales se utilizan los micronúcleos como indicadores de efectos genotóxicos en organismos acuáticos, donde las respuestas son inducidas por una variedad de contaminantes, incluyendo hidrocarburos poliaromáticos, nitroaromáticos, y clorados; así como también pesticidas. Esta prueba se ha aplicado en invertebrados marinos, tal es el caso del mejillón cebra *Dreissena polymorpha* (Mersch *et al.*, 1996), del mejillón verde *Perna viridis* (Xu *et al.*, 1999; Siu *et al.*, 2004), el mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Taleb *et al.*, 2007); en peces marinos como *Gadus morhua* y *Scophthalmus maximus* (Bardiene *et al.*, 2005); en peces de agua dulce como *Astyanax bimaculatus* (Matsumoto y Cólus, 2000), *Labeo bata* y *Oreochromis mossambicus* (Talapatra *et al.*, 2006), y *Danio reiro* (Prieto *et al.*, 2007), entre otros.

El ensayo cometa también se ha utilizado en un gran número de estudios, para determinar la habilidad de los contaminantes acuáticos de inducir daños en el ADN. Se ha aplicado en invertebrados marinos como la ostra *Crassostrea virginica* (Nacci *et al.*, 1996), la almeja *Tapes semidecussatus* (Coughlan *et al.*, 2002; Hartl *et al.*, 2004), el mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Laffon *et al.*, 2006); en moluscos de agua dulce como *Unio tumidos* (Miloswka *et al.*, 2003) y *Corbicula fluminea* (Rigonato *et al.*, 2005); peces marinos como *Scophthalmus maximus* (Kilemade *et al.*, 2004; Hartl *et al.*, 2007); estuarinos como *Mugil sp* y *Netuma sp* (Andrade *et al.*, 2004) y dulceacuícolas como *Leuciscus cephalus* (Flammarion *et al.*, 2002; Winter *et al.*, 2004), *Oreochromis niloticus* (Matsumoto *et al.*, 2006).

Los estudios genotóxicos con especies nativas de peces, representan un importante esfuerzo para determinar los efectos potenciales de los agentes tóxicos presentes en un ecosistema. En este estudio como sustancia tóxica de referencia en bioensayos cortos se utilizó el glifosan (sal de isopropilamina de glifosato), compuesto usado en diferentes tipos de cultivo (café, frutales, plátano, aceite de

palma, caña de azúcar, entre otros) como herbicida sistémico de control total y con potencial ligeramente tóxico; que de acuerdo, a consultas realizadas en tiendas agropecuarias ubicadas en Cumaná, estado Sucre, es utilizado para la eliminación de malezas en diferentes cultivos hacia la zona de Cumanacoa, en las adyacencias del río Manzanares.

El glifosato ejerce su acción herbicida a través de la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa, impidiendo así que las plantas no deseadas o malezas elaboren aminoácidos aromáticos esenciales para su crecimiento y supervivencia. Debido a que la ruta metabólica del ácido shiquímico no existe en animales, la toxicidad aguda del glifosato es baja; sin embargo, puede interferir con algunas funciones enzimáticas, pero los síntomas de envenenamiento solo ocurren con dosis muy altas en mamíferos, de acuerdo a las aseveraciones de Kaczewer (2002) y Mañas *et al.* (2006).

Las formulaciones de glifosato también incluyen otros compuestos considerados inertes, que resultan ser (en ciertos casos) más tóxicos que el propio ingrediente activo. En la formulación además del principio activo (sal de isopropilamina de glifosato), se encuentran como surfactantes otras sustancias químicas, siendo la más frecuentemente utilizada el ácido polioxietilamina (POEA), cuya concentración varía de 6 a 18%, según los diferentes productos comerciales y la presencia del mismo POEA determina un aumento de la toxicidad del formulado (Burger y Fernández, 2004; Eslava *et al.*, 2007).

El glifosato es degradado por acción microbiana, también es altamente soluble en agua (12 g/l a 25 °C) y su persistencia en este ambiente es más corta (menos de dos semanas) que en suelos, debido a su capacidad de adsorción a partículas en suspensión como materia orgánica, mineral y sedimentos; no obstante, la vida media del compuesto es variable y depende de factores propios del suelo y clima. En organismos del medio acuático, los efectos subletales y/o toxicidad aguda del glifosato, dependen en gran medida de la edad de la especie, la dureza del agua, su temperatura y pH (Maldonado, 2003; Ramírez *et al.*, 2003)

Actualmente, la posible existencia de efectos indeseables tras la exposición humana o animal al herbicida, es un tema de controversia, ya que, la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1994) y la Agencia de Protección Ambiental de EEUU (EPA, 2003) concluyeron que el glifosato en sí, no es mutagénico ni carcinogénico. No obstante, se ha estimado su toxicidad y se han realizado estudios, entre los cuales se encuentra la medición de su efecto histopatológico en branquias, hígado y riñón de la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus*; notando cambios predominantes tras 96 horas de exposición (Jiraungkoorskul *et al.*, 2002). En ejemplares juveniles del pez gato africano *Clarias gariepinus* también se observó la inducción de cambios histopatológicos en branquias, riñón, hígado y cerebro luego de 96 horas de exposición a glifosato, lo que indicó, que el herbicida es tóxico para juveniles de la especie (Ayoola, 2008). Por otro lado, igualmente por exposición al mismo herbicida y por tiempo similar, se ha demostrado su efecto genotóxico en células branquiales y en eritrocitos del pez *Prochilodus lineatus* (Cavalcante *et al.*, 2008).

Debido al riesgo que significa para la salud ambiental el uso de herbicidas con potencial tóxico y a la importancia ecológica y económica que representa el río Manzanares para el estado Sucre, se hace necesario el uso de las técnicas sensibles para el monitoreo de estos ecosistemas impactados por la acción antrópica. El test de micronúcleos y el ensayo cometa utilizados en este estudio demostraron efecto genotóxico del glifosato y de los sedimentos del río Manzanares, en células sanguíneas del pez *A. brevifilis*, de modo que este estudio ha contribuido a demostrar que el uso y aplicación indiscriminado de compuestos químicos puede resultar nocivo para la biota acuática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Para los ensayos de toxicidad aguda con glifosato y crónica con sedimentos, se utilizaron organismos del río Manzanares (cuenca alta) ubicado entre las coordenadas 10°11'030" N y 63°56'041" O; mientras que, para la detección *in situ* los organismos procedieron de las localidades río Yoraco (10°10'66" N, 63°56'33" O) y río Guasdua (10°62'29" N, 63°56'007" O). De estas dos últimas zonas que se describen a continuación, se tomaron los sedimentos que se utilizaron para el bioensayo de toxicidad crónica:

El río Yoraco: ubicado en la cuenca alta del río Manzanares, se caracteriza por presentar un cauce pedregoso, de caudal llano con corrientes ligeras y no profundas, de aguas transparentes, con vegetación arbórea en sus alrededores. Esta zona está bastante alejada de los centros poblados por lo que no se constató deterioro del medio ambiente por acción del hombre. Por esta razón se utilizó como una zona de referencia o no contaminada.

El río Guasdua: ubicado en la cuenca media del río Manzanares, presenta un cauce pequeño de fondo fangoso, aunque su caudal es abundante y de fuerte corriente, la orilla es muy abrupta y el agua es turbia, de tonalidades negras. Este afluente presenta un alto grado de intervención; originado principalmente por la actividad agrícola y los asentamientos de viviendas, cuyos desechos en su mayoría van a dar a este cuerpo de agua.

Captura de los organismos

Los ejemplares juveniles de *Ancistrus brevifilis*, se capturaron mediante el empleo de una red de 5 m de largo por 1,15 m de alto con diámetro de malla variable: en el centro 3 mm y en los extremos 7 mm.

El transporte de estos organismos se realizó en cavas plásticas aireadas hasta

el Laboratorio de Genética del Instituto Oceanográfico de Venezuela (IOV). Posteriormente, los ejemplares se colocaron en acuarios de 30 litros de capacidad, debidamente aireados y con temperatura de 21 ± 2 °C. Allí se mantuvieron por un período de 2 semanas antes de realizar los bioensayos. Los organismos se alimentaron interdiariamente y el recambio de agua se realizó cada 3 días.

Bioensayos

Bioensayo de toxicidad aguda con glifosato:

Previamente se realizó una prueba de toxicidad aguda por 96 horas con el herbicida, a fin de calcular la concentración letal media ($LC_{50} = 7,66$ ppm), a través del programa desarrollado por Stephan (1971); que permitió la selección de las dosis subletales de glifosato empleadas en un bioensayo posterior. Para el ensayo inicial, se utilizaron 20 individuos, divididos en grupos de 4 que se colocaron en envases de vidrio de 3 litros, con sus respectivas réplicas. A partir de la dosis letal media encontrada, se realizó un segundo bioensayo; se escogieron tres concentraciones del herbicida (1; 3 y 5 ppm) más un control con sus respectivas réplicas, utilizando 6 individuos por concentración en envases de vidrio de 3 litros, que estuvieron provistos de un sistema de aireación constante. Luego de 24 horas de preparadas las concentraciones, se colocaron 2 individuos por recipiente equivalente a 6 ejemplares por concentración. Al final del experimento transcurridas 96 horas, se midió el efecto del glifosato sobre el ADN en las células sanguíneas de *A. brevifilis*.

Bioensayo de toxicidad crónica con sedimentos:

Los sedimentos se retiraron de Yoraco y de Guasdua con un nucleador manual; de Guasdua se tomaron los sedimentos a partir de un punto inicial (0) y a 100 y 200 m de ese lugar, aguas abajo. Todos los sedimentos se depositaron en bolsas plásticas y se mantuvieron en cavas refrigeradas para su transporte y posterior utilización. Se utilizaron 36 ejemplares de *A. brevifilis* para el bioensayo, colocando 4 organismos en cada envase destinado a cada uno de los tipos de sedimentos utilizados, con sus respectivas réplicas; lo que es igual a 8 individuos por muestra de

sedimento, que permanecieron allí por un período de 21 días. Las muestras de sangre para medir el daño al ADN se tomaron a intervalos de 10 y 11 días (t_0 , t_{10} , t_{21}); mientras que los recambios de agua y sedimento se realizaron cada 7 días; alimentándose los peces de lo que el propio sustrato podía darles.

Detección *in situ*:

Se tomaron muestras de sangre de 10 organismos de cada uno de los sitios de donde se extrajeron los sedimentos (Yoraco y Guasdua). Las muestras de sangre se transportaron en cavas con refrigerantes al laboratorio, para realizar los ensayos de genotoxicidad.

Extracción de las muestras de sangre:

Cien microlitros (100 μ l) de sangre se extrajeron de cada organismo por punción directa al corazón con jeringas para insulina cuyas paredes fueron previamente heparinizadas. Se tomaron 25 μ l de sangre que se enrasaron a 250 μ l con buffer fosfato salino pH 6,8 en tubos eppendorf. Esta mezcla se centrifugó tres veces a 1000 rpm durante 2 minutos a 4 °C; el precipitado, que posteriormente se resuspendió en el mismo volumen de buffer fosfato antes mencionado, fue utilizado para medir la viabilidad celular y para la preparación de las láminas en el gel de agarosa para el ensayo cometa. Los 70 μ l restantes de sangre se utilizaron para la preparación de frotis sanguíneos para el ensayo de micronúcleos.

Viabilidad Celular:

Para todos los ensayos se estimó de la viabilidad celular por tinción de las células sanguíneas utilizando el colorante azul tripano al 0,4% ($m\ v^{-1}$) preparado en buffer fosfato salino pH 6,8. En una cámara de Neubauer se colocaron 40 μ l de suspensión celular y 20 μ l del colorante, posteriormente se procedió al conteo total de las células teñidas (muertas) y no teñidas (vivas) que proporcionó el porcentaje de células viables.

Detección de daños a nivel de ADN

Ensayo de micronúcleos:

El test de micronúcleos consiste en la determinación de alteraciones nucleares, fenómeno que ocurre como respuesta ante la perturbación a nivel celular durante la mitosis (Arcan-Hoy y Metcalfe, 2000). Los micronúcleos son cuerpos citoplasmáticos contentivos de cromatina que tienen un aspecto similar al del núcleo principal y se ven como pequeños núcleos en el citoplasma de las células interfásicas. Se generan tanto por rupturas cromosómicas como por mala segregación de cromosomas enteros durante la anafase de la división celular, quedando en ambos casos, una cantidad de ADN fuera de los núcleos hijos y dando el aspecto de pequeños núcleos o micronúcleos (Palma, 2005). Estos corpúsculos no poseen centrómero. Los micronúcleos pueden ser detectados por examinación en microscopio óptico o por fluorescencia de portaobjetos con ADN teñido (Sotil *et al.*, 2007; Torres-Bugarín *et al.*, 2007).

Los frotis sanguíneos, se realizaron de acuerdo a la metodología propuesta por Bagdonas *et al.* (2003), sobre portaobjetos limpios y desgrasados previamente codificados y secados al aire para su posterior fijación en metanol durante 10 min. La tinción de las láminas se realizó según el protocolo descrito por Cavas y Könen (2007), con Giemsa al 10% durante 25 min, luego se lavaron con agua destilada y se dejaron secar.

La frecuencia de células micronucleadas se registró a 100X de magnificación con la ayuda de un microscopio óptico y se examinó un total de 1000 células por cada pez. Se consideraron solo aquellas células que presentaron membrana celular y nuclear intacta, cuyos micronúcleos estuvieran claramente separados y a menos de 1/3 del diámetro del núcleo principal, tuvieran el mismo color, textura, plano de enfoque y refracción que el núcleo principal y su forma fuese oval o redonda (Zalacaín *et al.*, 2005). También se consideraron las anomalías nucleares entre ellas: las células binucleadas que presentaban dos

núcleos de tamaño similar; núcleos lobulados y puentes nucleares (Anexo 1).

Ensayo cometa:

El ensayo cometa desarrollado por Ostling y Johanson (1984) y modificado por Singh *et al.* (1988), está basado en la migración de fragmentos rotos del DNA durante la electroforesis. Este ensayo es utilizado para el análisis de microlesiones en sitios alcali-lábiles del ADN, por la medición de la migración microelectroforética de fragmentos de la molécula, desde el campo catódico hacia el campo anódico en geles de agarosa bajo condiciones alcalinas en células individuales; formando la apariencia de un cometa (Olive *et al.*, 1992; Fairbairn *et al.*, 1995; Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2005).

Se siguió el protocolo descrito por Singh *et al.* (1988) con algunas modificaciones. Muestras de 5 µl de suspensión celular se mezclaron con alícuotas de 2 gotas de agarosa de punto de fusión normal preparada al 0,4% a 37 °C, y se colocaron después sobre láminas portaobjetos, las cuales estuvieron previamente cubiertas con una fina capa de agarosa al 0,5%, secadas a temperatura ambiente por dos horas. Inmediatamente, las muestras aplicadas a las láminas se taparon con cubreobjetos y se llevaron a 4 °C por 10 min para permitir la solidificación del gel. Luego de removidos los cubreobjetos, los portaobjetos se cubrieron con una tercera capa de agarosa (0,5%) y se colocaron nuevamente a 4 °C para la solidificación del gel.

Las láminas se sumergieron durante una hora en una solución de lisis (dimetil sulfoxido al 10%, NaCl 2,5 mol l⁻¹, Na₂-EDTA 100 mmol l⁻¹, Tris 10 mmol l⁻¹, pH 10,0 y tritón X-100 al 1%). Posteriormente, se colocaron en una unidad de electroforesis horizontal (Sigma Chemical Co), contentiva de buffer fresco alcalino (Na₂-EDTA 1 mmol l⁻¹, NaOH 300 mmol l⁻¹, pH 12,6) y allí permanecieron por 20 min a 4 °C para permitir el desenrollamiento del ADN antes de la electroforesis, la cual se realizó a voltaje constante de 0,25 V durante 10 minutos. El desplazamiento de los fragmentos de ADN se determinó del polo

negativo hacia el polo positivo.

Las láminas que representaron el control positivo de cada uno de los individuos, se expusieron por 5 minutos a peróxido de hidrógeno (30% v v⁻¹) para inducir el daño al ADN. Luego se procedió con la lisis y la electroforesis.

Después de la electroforesis, las láminas se lavaron suavemente con buffer Tris 0,4 mol l⁻¹ pH 7,5 se mantuvieron refrigeradas hasta su observación y la tinción se realizó con bromuro de etidio (20 µg ml⁻¹).

Para las observaciones de las láminas se usó un microscopio de fluorescencia Van Guard serie 1200 ECM equipado con filtro de excitación de 535 a 550 nm y un filtro de barrera de 580 nm. La migración del ADN se determinó por medición de la longitud (µ) de la cola del cometa en 25 células tomadas al azar por cada lámina preparada (2 láminas por organismo) y los cometas observados se clasificaron en cuatro clases: 0, 1, 2 y 3, donde 0 no representa daño y 3 representa la máxima lesión en el ADN (Wilson *et al.*, 1998; Anexo 2).

Métodos estadísticos:

Al no cumplirse con alguno de los supuestos del Análisis de Variancia y del t-student, se aplicaron pruebas estadísticas no paramétricas. En los ensayos de toxicidad aguda y crónica para la detección de los daños en el ADN se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y para la detección *in situ* un Kolmogorov-Smirnov en el análisis genotóxico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayo de toxicidad aguda con glifosato:

Los resultados obtenidos revelaron que la dosis más alta de glifosato insidió de manera significativa en la inducción de micronúcleos y alteraciones nucleares (Figura 1). Diferencias muy significativas ($KW=12,64$; $p<0,01$) se hallaron respecto a la presencia de células micronucleadas, con la formación de dos grupos homogéneos: el primero conformado por los individuos pertenecientes al control negativo (0 ppm) y los que estuvieron expuestos a las concentraciones de 1 y 3 ppm y el segundo constituido por aquellos individuos expuestos a la concentración más alta (5 ppm). En el caso de las alteraciones nucleares, las diferencias estadísticas encontradas resultaron significativas ($KW=8,30$; $p<0,05$) y se notó también la formación de dos grupos homogéneos iguales a los presentes en micronúcleos.

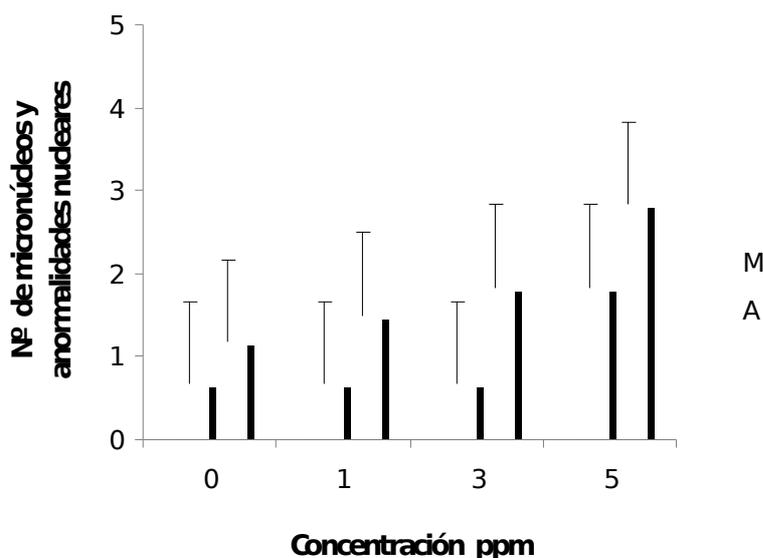


Figura 1.- Número de micronúcleos y anormalidades nucleares presentes en células sanguíneas de *A. brevifilis* por exposición aguda a glifosato durante 96 horas ($n=6$). M= micronúcleos, A= anormalidades nucleares.

El promedio de células viables durante el estudio fue de 90,53% (bioensayo de toxicidad aguda con glifosato= 91,96, bioensayo de toxicidad crónica con sedimentos= 90,96% y en la detección *in situ*= 88,67%), valor apropiado para el

desarrollo de ensayos genotóxicos, por la proporción de células que se encontraron en buen estado.

Por otra parte se encontraron diferencias altamente significativas por tipo de cometa y longitud de la cola del mismo (KW=42,60; $p < 0,0001$ y KW=42,56; $p < 0,001$, respectivamente; Figura 2). Para los tipos de cometas se observó la formación de tres grupos homogéneos: el primero establecido por los individuos del control negativo, el segundo por los ejemplares expuestos a la concentración de 1 ppm y el tercero por aquellos organismos pertenecientes a las concentraciones de 3 y 5 ppm. Para la longitud de la cola de los cometas, se evidenciaron dos grupos homogéneos, uno establecido por los individuos del control negativo y los de la concentración de 1 ppm y el otro grupo por los organismos pertenecientes a las concentraciones de 3 y 5 ppm.

Se hallaron diferencias estadísticas significativas con la técnica de micronúcleos y con el ensayo cometa, a pesar de monitorear niveles de organización distintos del ADN; en el caso de micronúcleos a nivel de estructuras cromosómicas y aparato mitótico; mientras que para el ensayo cometa se monitorea a nivel de roturas de cadenas simples y sitios álcali lábiles en el ADN. El efecto del glifosato, sobre la formación de micronúcleos y alteraciones nucleares en células sanguíneas de la guaraguara *A. brevifilis* fue significativa en aquellos individuos expuestos a la concentración de 5 ppm (Figura 1); mientras que, para el ensayo cometa, se registró sensibilidad en los ejemplares expuestos a las concentraciones de 3 y 5 ppm del herbicida (Figura 2).

Los estudios de genotoxicidad con glifosato, arrojan resultados variables y controversiales sobre el efecto que ocasiona a nivel citogenético y directamente en el ADN. Esto depende en gran magnitud, del grado de pureza del agente activo; así como, de la naturaleza del resto de los compuestos que lo conforman (Mañas *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 2009).

El glifosato es un ácido orgánico débil formado por una molécula de glicina y

otra de fosfometilo (N-(fosfometil) glicina). En su formulación más frecuente, los ingredientes básicos son: la sal de isopropilamida (IPA) del glifosato, un surfactante y agua. El surfactante permite solubilizar el ingrediente activo en agua y colaborar en la difusión del mismo a través de la superficie de la planta; mientras que, los “ingredientes inertes” aumentan la permeabilidad y atraviesan la barrera cuticular vegetal (Burger y Fernández, 2004; Donadío *et al.*, 2009).

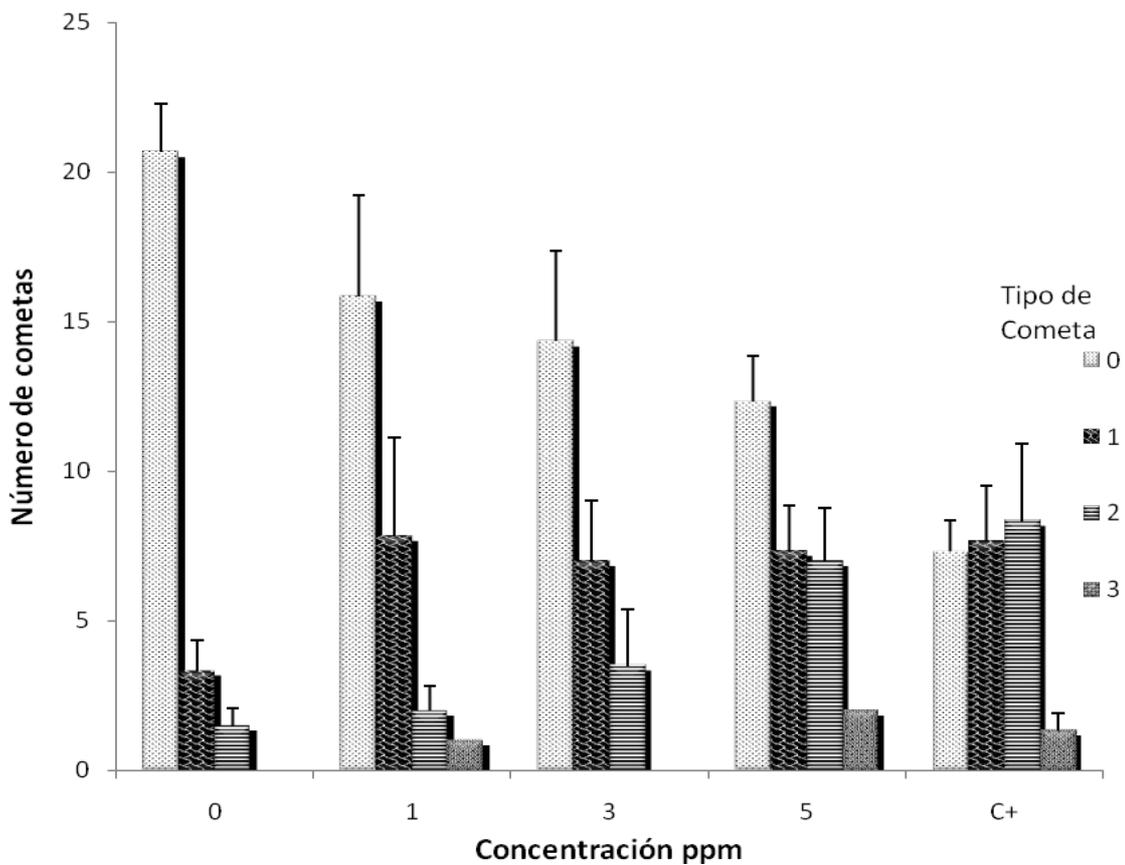


Figura 2.- Número y tipos de cometas encontrados en células sanguíneas de *A. brevipilis* por exposición aguda a glifosato. C+= control positivo, células expuestas a H₂O₂ durante 96 horas (n=6).

Química y físicamente el glifosato se asemeja a muchas sustancias que se encuentran en la naturaleza y no es especialmente reactivo. Se ha afirmado que es poco móvil en los suelos, no tiene gran persistencia biológica y tampoco es bioacumulable ni se biomagnifica a lo largo de la cadena alimenticia (Solomon *et al.*, 2005; Eslava *et al.*, 2007). No obstante, el glifosato a pesar de ser removido

rápida del agua por la adsorción a los sedimentos y las partículas de materia suspendidas; puede ser tóxico y biodisponible para organismos que se alimentan por filtración, así como, para organismos que ingieren cantidades significativas de sedimentos durante su alimentación diaria, incluyendo peces, anfibios y algunos mamíferos (Donadío *et al.*, 2009).

Hayes y Laws (1991), indicaron que el mecanismo de acción tóxica de este herbicida organofosforado no inhibidor de las colinesterasas en el hombre y en los animales, está vinculado al desacople de la fosforilación oxidativa. Según Prasad *et al.* (2009), el mecanismo molecular responsable de la actividad genotóxica del glifosato no está del todo dilucidado. Sin embargo, la formación de estructuras como micronúcleos y cometas sugieren que este compuesto interactúa e induce daño a nivel de la cromatina, que puede ser causado por un incremento de los sitios alcalilábiles del ADN. Estos sitios generalmente, son producidos en lugares no básicos de la molécula y que pueden ser revelados bajo condiciones de desnaturalización de la estructura secundaria del ADN.

Astiz *et al.* (2009), demostraron que el glifosato es un activo productor de estrés oxidativo e inductor de daños a biomoléculas que incluyen al ADN; por su parte, Anadón *et al.* (2009), indicaron que tanto el mencionado compuesto como el AMPA (principal metabolito ambiental del glifosato) tienen una lenta eliminación del organismo, lo que le permite estar en contacto por suficiente tiempo con los tejidos como para producir efectos sistémicos. Además, Mañas *et al.* (2009a) y Mañas *et al.* (2009b), encontraron que tanto el glifosato como el AMPA son genotóxicos considerando los resultados obtenidos del ensayo cometa, micronúcleos y aberraciones cromosómicas y que el AMPA tiene tanto o mayor potencial toxicogénico que la molécula parental.

Lushchak *et al.* (2009), en el pez goldfish *Carassius auratus* encontraron que la baja toxicidad del herbicida glifosato puede causar efectos adversos en las defensas antioxidantes de los peces. Otros herbicidas han sido utilizados para medir lesiones en el ADN, Henao *et al.* (2005), encontraron daño acumulativo del ADN a

través del ensayo cometa en muestras de sangre de la tilapia roja *Oreochromis* sp. por exposición crónica a los plaguicidas cipermetrina y diazinón; Könen y Cavas (2008), demostraron incremento en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos periféricos de la tilapia del nilo *Oreochromis niloticus* por exposición al herbicida trifluralin y su equivalente comercial treflan.

No obstante, Mañas (2010), ha indicado que los aspectos más controversiales de la toxicidad de glifosato, están relacionados a su potencial capacidad de producir toxicidad crónica; ya que justamente, sus efectos al no observarse inmediatamente, contribuyen a establecer una sensación de seguridad que a su vez potencia el uso irresponsable del herbicida; creando un círculo vicioso y silencioso que incrementa paulatinamente el riesgo de exposición humana, a través del agua y los alimentos contaminados con glifosato.

Bioensayo de toxicidad crónica con sedimentos:

Los números de micronúcleos y las alteraciones nucleares en células sanguíneas de *A. brevivilis* por exposición a los sedimentos de las localidades de Yoraco y Guasdua pueden observarse en la Figura 3. Se muestra un incremento de células micronucleadas con el aumento del tiempo de exposición; comportamiento que no se observó, en las alteraciones nucleares presentes en individuos expuestos a sedimentos de Guasdua 0 y 100 , cuya tendencia luego de aumentar tras 10 días de exposición, descendió a los 21 días. Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas (KW=7,90; $p>0,05$) por la presencia de células sanguíneas micronucleadas en *A. brevivilis* de acuerdo a los sedimentos utilizados; no obstante si se encontraron diferencias significativas (KW=8,18; $p<0,05$) por tiempo de exposición a los mismos sedimentos; notándose la formación de dos grupos homogéneos conformados, el primero por los individuos del día 0 y los expuestos durante 10 días; mientras que, el segundo grupo estuvo formado por aquellos ejemplares expuestos por 21 días.

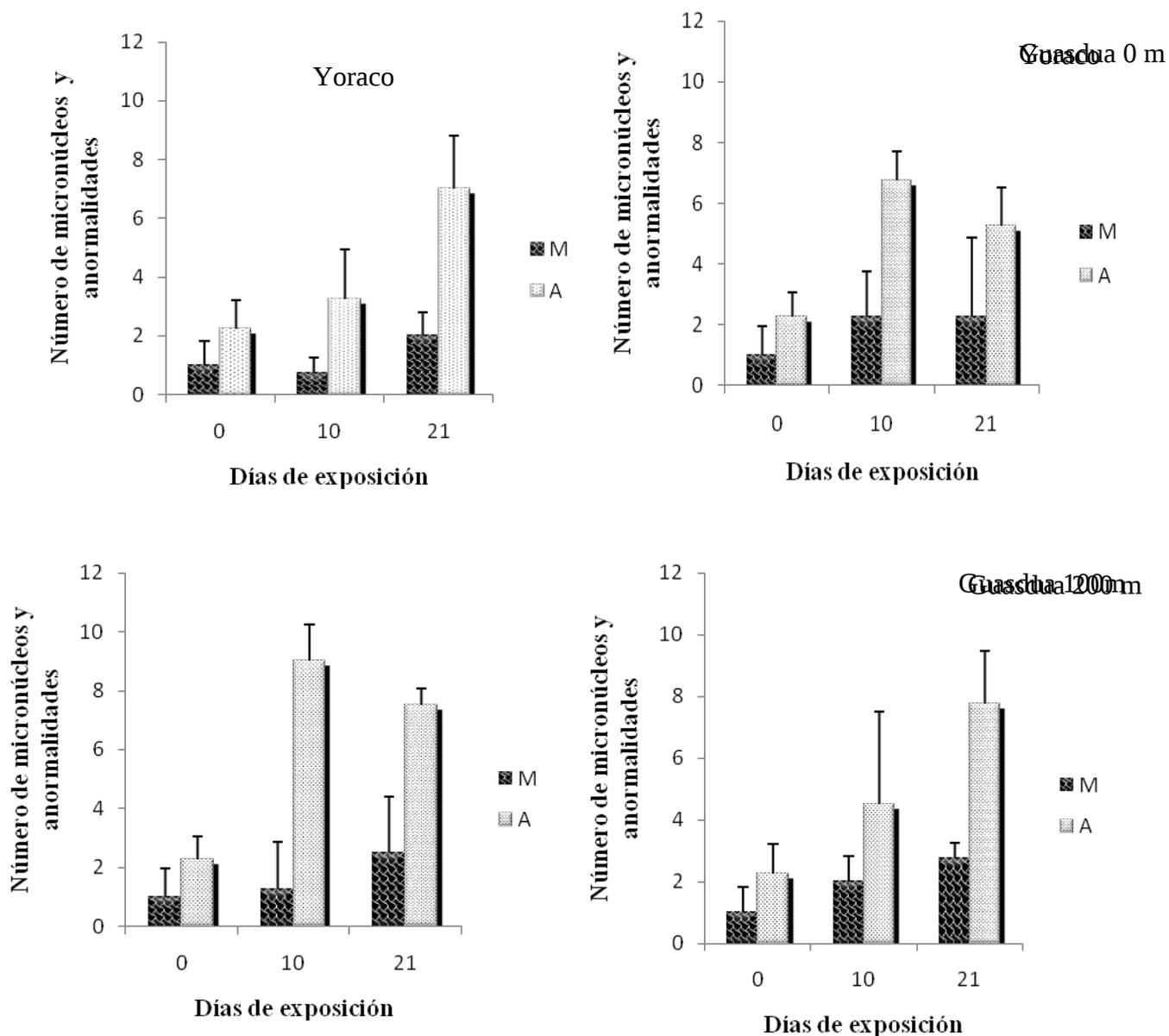


Figura 3.- Número de micronúcleos y anomalías nucleares presentes en células sanguíneas de *A. brevifilis* por exposición crónica (0, 10 y 21 días) a diferentes tipos de sedimentos (Yoraco y Guasdua 0, 100 y 200 m; n=6). M= micronúcleos, A= anomalías nucleares.

Las alteraciones nucleares resultaron significativas (KW=13,17; $p < 0,05$) por tipo de sedimento y se establecieron tres grupos homogéneos: los individuos del control negativo (0 días) representaron el primer grupo, el segundo aquellos ejemplares expuestos a sedimentos de Yoraco y Guasdua 0 y 200 m y el tercer grupo por aquellos individuos expuestos a sedimentos de Guasdua a 0, 100 y 200 m.

Respecto al tiempo de exposición, las diferencias en cuanto a alteraciones nucleares en células sanguíneas de *A. brevifilis* también resultaron significativas (KW=20,15; $p<0,05$) y se constituyeron dos grupos homogéneos: el primero formado por los individuos del tiempo 0 días y el segundo por los individuos expuestos durante 10 y 21 días.

A través del ensayo cometa (Figura 4), de manera general, se observó el predominio de los cometas tipo 0 en células sanguíneas de la especie, para tres de los cuatro tipos de sedimentos utilizados (Yoraco y Guasdua 0 y 200 m) a lo largo de los tres tiempo de muestreo (0, 10 y 21 días). No obstante, se evidenciaron diferencias altamente significativas (KW=20,15; $p<0,001$) entre los cometas encontrados en los distintos sedimentos a los cuales estuvo expuesta la guaraguara *A. brevifilis* y se hallaron dos grupos homogéneos: el primero establecido por los individuos del control negativo y el segundo por los individuos expuestos a sedimentos de Yoraco y Guasdua 0, 100 y 200 m. La longitud de la cola de los cometas hallados por tipo de sedimento resultó altamente significativa (KW=21,38; $p<0,001$) y se formaron dos grupos idénticos a los encontrados por tipo de cometa.

Respecto al tiempo de exposición, las diferencias encontradas por tipos de cometas en células sanguíneas de *A. brevifilis* resultaron altamente significativas (KW=18,42; $p<0,001$). Dos grupos homogéneos se formaron: el primero representado por los individuos del tiempo 0 y el segundo por los expuestos durante 10 y 21 días. Las diferencias en cuanto a la longitud de la cola de los cometas por tiempo de exposición también fue altamente significativa (KW= 19,30; $p<0,001$) y los grupos formados fueron iguales a los mencionados anteriormente.

De acuerdo a los resultados obtenidos, son variables las diferencias estadísticas que se hallaron con las distintas técnicas utilizadas, para la detección de daños en el material genético de células sanguíneas del pez *A. brevifilis*; notándose así que, las alteraciones nucleares si fueron significativas por tipo de sedimento utilizado: Yoraco y Guasdua (0, 100 y 200 m). Mientras que, tanto para micronúcleos como para ensayo cometa, no se registraron tales diferencias en células

sanguíneas de la especie, tras la exposición a los sedimentos antes mencionados; siendo similar su efecto sobre el ADN; ocasionado ello probablemente, por el desarrollo agrícola presente en las zonas.

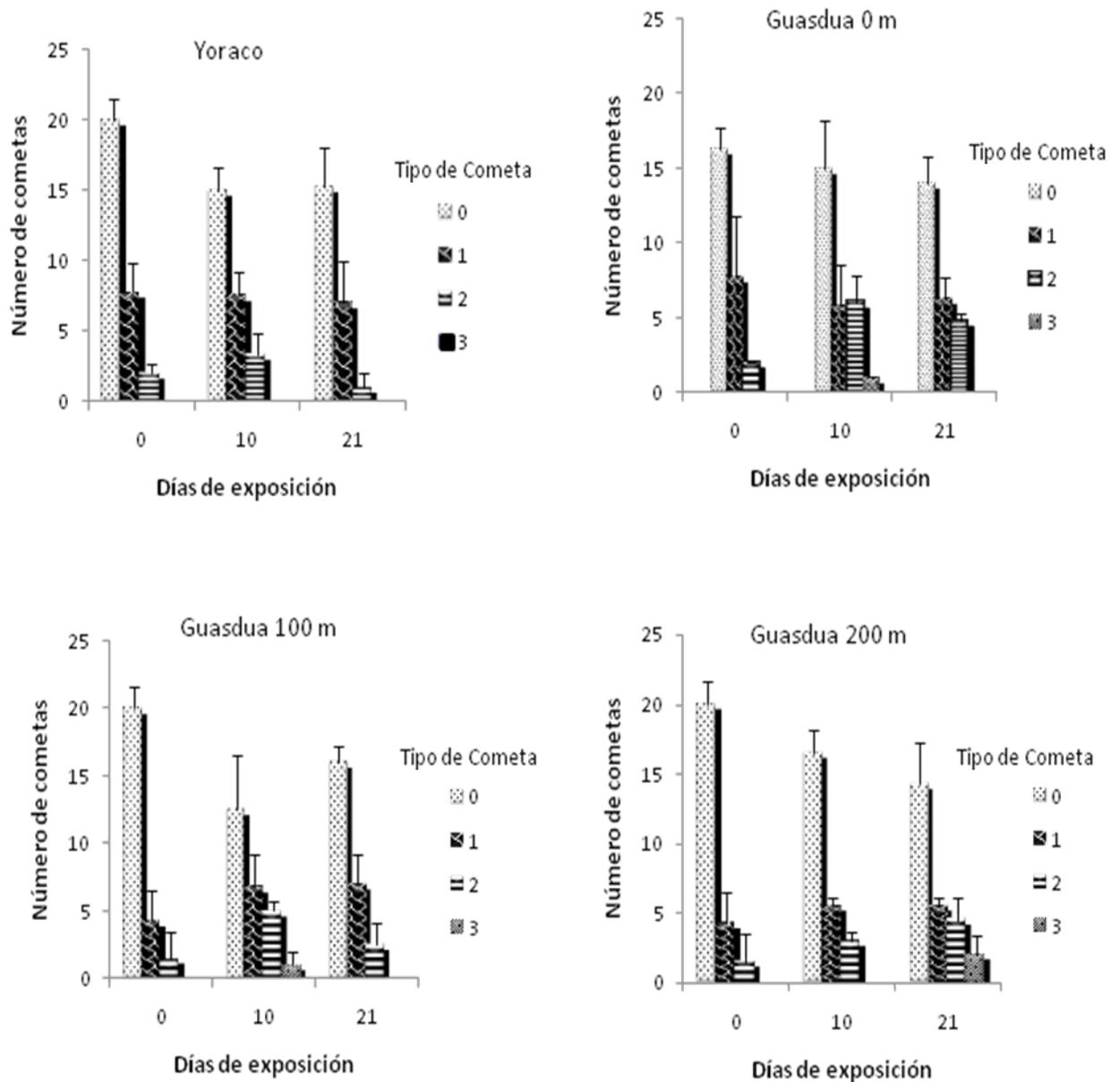


Figura 4.- Número y tipo de cometas encontrados en células sanguíneas de *A. brevilis* por exposición crónica (0, 10 y 21 días) a diferentes tipos de sedimentos (Yoraco y Guasdua 0, 100 y 200 m). C+= control positivo, células expuestas a H₂O₂ (n=6).

Las lesiones del material genético pueden ser causada por varios factores entre los que se encuentran: las condiciones de experimentación y exposición a residuos contaminantes, donde la presencia de estos últimos fue constatada durante el muestreo realizado de los sedimentos, específicamente en Guasdua 100 metros; donde se registró el mayor número de alteraciones nucleares en células sanguíneas de la guaraguara.

Las alteraciones nucleares y micronúcleos (Figura 3) aumentaron distintamente con los tiempos de exposición a sedimentos. Los agentes que inducen aneuploidía que pueden ser no genotóxicos porque su blanco no es el ADN, bien pueden inducir efectos a nivel de enzimas que participan en los procesos de reparación y replicación del ADN y en proteínas del huso (Palma, 2005); que pudieron causar aumento significativo de las anormalidades o lesiones nucleares; siendo consideradas indicadores de genotoxicidad en adición a las formas típicas de micronúcleos.

Lárez (2007), en el pez *A. brevifilis* por exposición crónica a sedimentos del río Manzanares encontró rupturas del ADN en células sanguíneas de la especie; haciéndose notorio el mayor daño en aquellos individuos que estuvieron expuestos a sedimentos de Guasdua por 21 días; donde el número de cometas tipo 1 y 2 se incrementaron significativamente. Özcan *et al.* (2009), muestrearon sedimentos en cuatro diferentes sitios del río Kars y en tres de los cuatro lugares muestreados se demostró actividad genotóxica en la sangre periférica de *Orthrias angorae*, dada las diferencias estadísticas encontradas en la frecuencia de micronúcleos entre el grupo control y el grupo expuesto por un período de seis días. Por otro lado, Campagna *et al.* (2008) en estudios histopatológicos por exposición crónica parcial de juveniles de las especies *Danio rerio* y *Poecilia reticulata* a sedimentos de río Monjolinho São Carlos-São Paulo/Brazil, demostraron toxicidad encontrando alteraciones como hiperplasia en branquias y fusión de lamelas secundarias.

Los estudios con sedimentos conducidos en laboratorios asemejan lo más

cercanamente posible las condiciones naturales en las que se encuentran los organismos en su hábitat natural. No obstante, por la restricción estática de la simulación artificial de la experimentación, las respuestas obtenidas pueden o no ser similares a las conseguidas en el campo, que dependerá en muchos casos de la presencia de agentes estresores, y su biodisponibilidad en agua y sedimento, entre otros factores.

Burton y Landrum (2003), indicaron que inicialmente la contaminación de los sedimentos ocurre debido a partículas de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos que se asientan en los fondos de los cuerpos de agua; uniéndose a la matriz interior de los sedimentos permaneciendo allí por largos periodos de tiempo y acumulándose dentro de pequeñas partículas de grano fino. De allí la importancia de las comunidades bentónicas y de la presencia de contaminantes en los sedimentos como fuente de alimentación y como hábitat. Sin embargo, son muchos los factores que pueden alterar la biodisponibilidad de los contaminantes en el sedimento; puesto que, las concentraciones residuales en la superficie de agua y suelo y su efecto en los organismos acuáticos proveen en muchos casos respuestas insignificantes de toxicidad directa por un xenobiótico.

Así mismo, Chen y White (2004), hicieron referencia a los sedimentos como sustrato propio de los ecosistemas acuáticos, que pueden actuar también como fuente de contaminación para aquellos organismos que habitan en los fondos, donde la actividad genotóxica de compuestos orgánicos está asociada principalmente a movimiento post-emisión y partición de compuestos hidrofóbicos que son adsorbidos por el material particulado en suspensión; y que consecuentemente por el proceso de sedimentación facilita la exposición de la fauna bentónica implicando riesgos debido a la bioacumulación y persistencia a través de la cadena trófica.

De acuerdo a la literatura existente, los estudios realizados en el río Manzanares (Martínez y Senior, 2001; Senior *et al.*, 2003; Senior *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2005; Gonzáles, 2006) demostraron que en los últimos años el aumento de las actividades generadas por el hombre y la ocupación anárquica del

espacio, han venido deteriorando el entorno natural en detrimento de la calidad medio ambiental, con posible influencia sobre la salud de sus habitantes, especialmente aquellos que viven en ambientes acuáticos.

Detección *in situ*:

La Figura 5, muestra una mayor proporción de anomalías nucleares con respecto a los micronúcleos presentes en células sanguíneas de *A. brevifilis* tomadas en las localidades de Yoraco y Guasdua. De acuerdo al análisis estadístico, se encontraron diferencias significativas ($KS=1,58$; $p<0,05$) a través de la prueba de micronúcleos en los promedios de las localidades estudiadas; pero no se registraron tales diferencias ($KS=1,05$; $p>0,05$) para las anomalías nucleares.

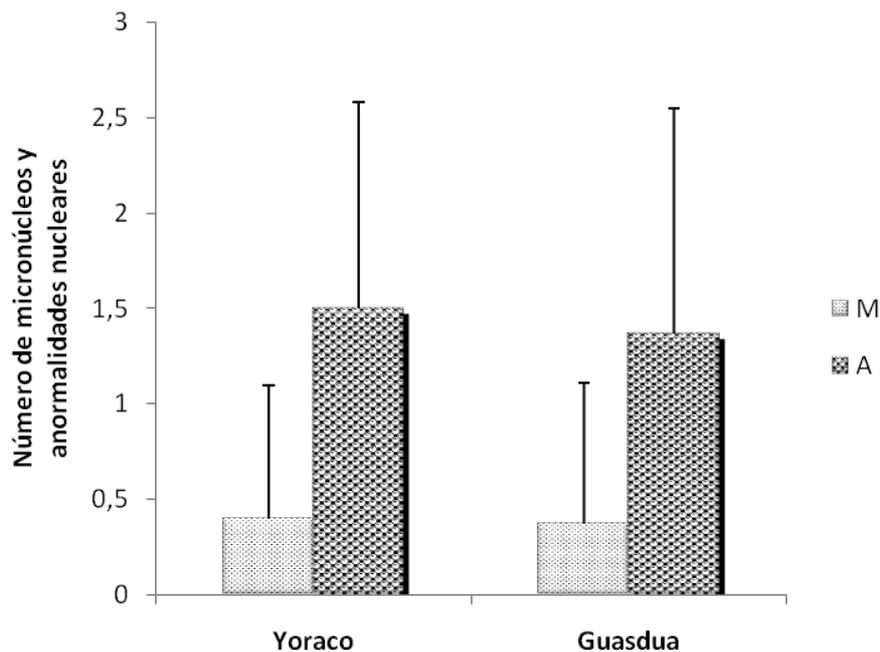


Figura 5.- Número de micronúcleos y anomalías nucleares presentes en células sanguíneas de *A. brevifilis* proveniente de las localidades de Yoraco y Guasdua ($n=10$). M= micronúcleos, A= anomalías nucleares.

En el caso del ensayo cometa (Figura 6), se notó el predominio de los cometas tipo 0 para ambas localidades; registrándose diferencias altamente significativas ($KS=9,22$; $p<0,001$) entre los promedios de cometas encontrados en la localidad de Yoraco y Guasdua. Estos resultados son similares a los obtenidos para la

longitud de la cola de los cometas presentes en células sanguíneas de *A. brevivilis*, donde se encontraron también diferencias altamente significativas (KS=9,22; $p < 0,001$).

Los ríos desde tiempos remotos han sido utilizados como vía de eliminación de aguas residuales y de desechos sólidos. De acuerdo con Zuleta y Meléndez (2001), es muy posible que gran parte de las aguas contengan mutacarginógenos, derivados de las diversas vías y actividades desarrolladas por el hombre y que contribuyen a que las aguas se carguen de compuestos como hidrocarburos aromáticos policíclicos, cloro, ozono, aminas heterocíclicas, compuestos nitroaromáticos, entre otros; cuya incidencia en el medio ambiente puede conllevar a alteraciones de distinta magnitud en la biota de los cursos de agua. De manera que, los organismos acuáticos no blanco podrían estar expuestos a estos xenobióticos por aplicaciones directas y por aportes de residuos que llegan a los cuerpos de agua provenientes de ambientes terrestres y de la atmósfera (Henaó *et al.*, 2005).

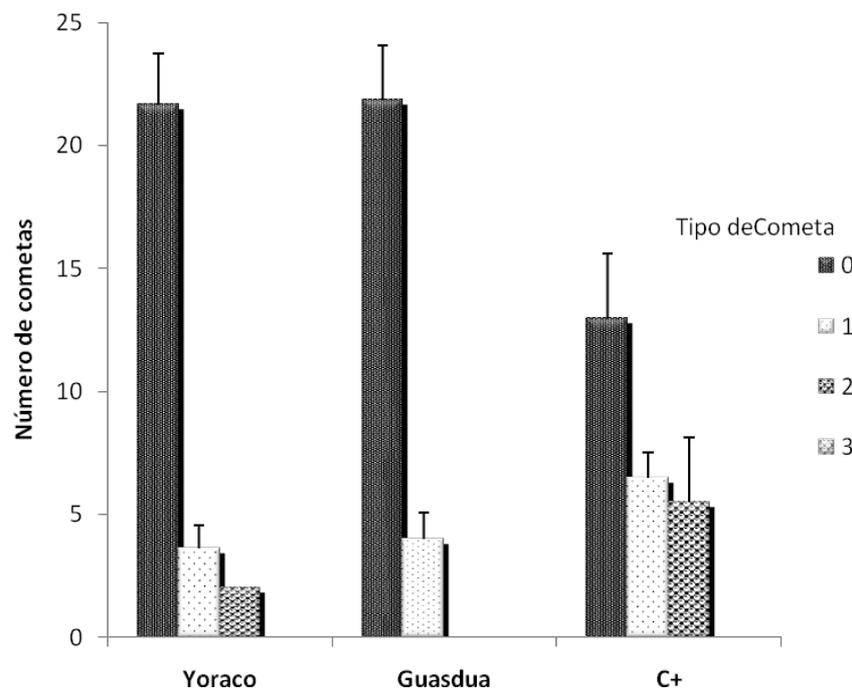


Figura 6.- Número y tipos de cometas encontrados en células sanguíneas de *A. brevivilis* proveniente de las localidades de Yoraco y Guasdua. C+= control positivo, células expuestas a H_2O_2 (n=10).

Las sustancias tóxicas depositadas en los cuerpos de agua y sedimentos, bien por, lixiviación, escorrentía, precipitación o por acción intencionada, tienen un impacto significativo en los ecosistemas naturales; ya que, generalmente, la mayoría de estos xenobióticos alcanzan los ambientes acuáticos en pequeñas cantidades que pueden ser asimiladas por los organismos. Basados en los resultados obtenidos, no es fácil atribuir los daños observados a un factor en particular, ello implica, el efecto sinérgico de una variedad de compuestos químicos y factores medio ambientales que causan daños en el ADN y que está relacionado con la metabolización de los xenobióticos.

El río Manzanares en los últimos años se ha visto desfavorecido por las diversas actividades que se desarrollan en su entorno, entre ellas la agricultura, la presencia de areneras y el aumento progresivo de centros poblados a lo largo de sus márgenes; viéndose afectados en diferente medida los tributarios que lo conforman. A pesar de ello y a las diferencias encontradas por efecto genotóxico en células sanguíneas del pez *A. brevifilis* muestreado en las localidades de Yoraco y Guasdua (Figura 5 y 6), es evidente que el daño causado por los contaminantes presentes en estos ríos es menor, al ser comparado con los con resultados obtenidos de los valores basales obtenidos para el día 0 (cero) en el ensayo de toxicidad con sedimentos (Figura 3 y 4); siendo también menores, a los encontrados por otros autores en otras latitudes.

En el contexto anterior, Ayllón *et al.* (2000), que a través del test de micronúcleos aplicado en riñón cefálico de la trucha marrón *Salmo trutta* pudieron discernir sobre la sensibilidad de la prueba; aplicada a diferentes poblaciones de la trucha que habitaban en ecosistemas con distintos niveles de contaminación del río Trubia (Asturias, al norte de España), observando incremento de micronúcleos en la zona más afectada. Porto *et al.* (2005), midieron el efecto genotóxico del mercurio en tres especies de peces: coporo *Prochilodus nigricans* (detritivoro), palometa *Mylossoma duriventris* (omnivoro) y guabina *Hoplias malabaricus* (piscívoro) tomados de los ríos Madeira (zona contaminada) y Solimões (área no contaminada)

del Amazonas, a través de la prueba de micronúcleos y encontraron incremento altamente significativo en la frecuencia de células micronucleadas para los individuos muestreados en el río Madeira comparado con las mismas especies tomadas de río Solimões y que además la presencia de micronúcleos era cinco veces más alta para la especie piscívora que para la omnívora y detritívora. Hafes (2009), en células sanguíneas, hepáticas y branquiales del pez *Mugil cephalus* tomado en cuatro diferentes localidades de la Bahía Abu-Quir, encontró, que a través de la técnica de micronúcleos, anormalidades nucleares y aberraciones cromosómicas; los resultados obtenidos responden diferencialmente al estrés ambiental al que están sometidos los organismos.

Respecto al ensayo cometa, Lárez (2007), detectó diferencias significativas en daños del ADN en tejido sanguíneo de la guaraguara *A. brevifilis* muestreada en las localidades de Aricagua y Guasdua del río Manzanares; sin embargo los resultados actuales hallados para la localidad de Guasdua muestran la presencia solo de cometas tipo 0 y 1 que difieren de los encontrados por Lárez (2007) que también encontró en la misma localidad cometas tipo 2 y 3. Kopjar *et al.* (2008), evaluaron la integridad del ADN por medio del ensayo cometa en eritrocitos del pez *Cobitis elongata* en dos sitios del río Sava y en el río Kuper (Croacia), que presentaban diferencias en cuanto a calidad del agua; de acuerdo a sus resultados el efecto genotóxico obtenido fue significativamente alto para los dos sitios del río Sava en comparación con el río Kuper.

Por otro lado, Grisolia *et al.* (2009), emplearon las técnicas de micronúcleos y ensayo cometa en una variedad de especies de peces tropicales (*Geophagus brasiliensis*, *Cichla temensis*, *Hoplias malabaricus*, *Astyanax bimaculatus lacustres*, *Oreochromis niloticus*, *Cyprinus carpio* y *Steindachnerina insculpit*) tomados del lago Paranoá, el cual recibe de manera inadecuada descargas de agua producto del crecimiento de la población y notaron que las diferencias en la frecuencia de daños en el ADN en organismos que habitan en una misma zona, estaban asociadas a los hábitos alimenticios, a la sensibilidad de los organismos a los agentes genotóxicos y a sus respuestas y relaciones en el ecosistema.

Srut *et al.* (2010), en eritrocitos del pez marino *Dicentrarchus labrax* encontraron daños significativos del ADN medido por ensayo cometa pero no así, a través del test de micronúcleos; esto por exposición *in situ* en dos bahías diferentemente impactadas del mar Adriatico: Kaštela y Nečujam. Por otro lado, Klobucar *et al.* (2010), realizaron biomonitoreo *in situ* de daños en el ADN por ensayo cometa y micronúcleos en la carpa *Cyprinus carpio* durante 3 semanas de 3 otoños consecutivos, en dos sitios polucionados del río Drava (Belisce y Osijek) y una zona de referencia, el parque natural Kopacki; ubicados en Croacia; encontrando que en el pez carpa muestreado en los sitios con mayor influencia antropogénica se obtuvieron los mayores promedios de daños en el ADN tanto por micronúcleos como por ensayo cometa.

De acuerdo a los resultados obtenidos para la detección *in situ*, las lesiones del material genético indicaron que estos daños son mínimos, pudiendo ser atribuidos a los daños diarios a los que está expuesta la molécula de ADN, ya que el efecto genotóxico encontrado, fue mucho menor al hallado en el bioensayo de toxicidad aguda y crónica. No obstante, son evidentes las diferencias encontradas durante la detección *in situ* entre las localidades de Yoraco y Guasdua; siendo la primera zona mencionada donde se registró el mayor daño del ADN, en concordancia a los resultados obtenidos para micronúcleos y ensayo cometa; lo que sugiere que la localidad no es referencial.

CONCLUSIONES

El ensayo de toxicidad aguda con glifosato demostró efectos perjudiciales sobre la molécula de ADN en células sanguíneas del pez *A. brevifilis*, a pesar de las distintas aseveraciones que indican la corta actividad biológica del herbicida.

Durante el desarrollo del ensayo de toxicidad crónica, se incrementaron las lesiones en el ADN de células sanguíneas de *A. brevifilis*, a medida que se aumentó el tiempo de exposición a sedimentos de las localidades Yoraco y Guasdua (0, 100 y 200 m aguas abajo); sin embargo, por tipo de sedimento tras la exposición del pez, no se encontraron diferencias para micronúcleos y ensayo cometa, teniendo igual impacto sobre las células sanguíneas.

En muestreo realizado *in situ* de la guaraguara *A. brevifilis*, en condiciones naturales de las localidades Yoraco y Guasdua del río Manzanares, también se detectó efecto genotóxico en tejido sanguíneo de la especie en estudio; aunque este daño resultó menor al encontrado en el ensayo de toxicidad aguda y crónica; a pesar de ello, los daños encontrados fueron mayores en la localidad de Yoraco.

La sensibilidad de las técnicas empleadas: micronúcleos y cometas, varió diferencialmente respecto a la condición de experimentación.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, L. y Carvajal, J. 1976. La ictiofauna del complejo hidrográfico río Manzanares, Edo. Sucre, Venezuela. *Lagena*, 37–38: 23–35.
- Ali, F.; El-Shehawi, A. y Seehy, M. 2008. Micronucleus test in fish genome: a sensitive monitor for aquatic pollution. *Afr. J. Biotechnol.*, 7 (5): 606-612.
- Al-Sabti, K. y Metcalfe, C. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.*, 343 (2-3): 121-35.
- [Andrade, V.; Silva, J.; Silva, F.; Heuser, V.; Dias, J.; Yoneama, M. y Freitas, T.](#) 2004. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the comet assay and micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.*, 44: 459-468.
- Anadón, A.; Martínez-Larrañaga, M.; Martínez, M.; Castellano, V.; Martínez, M.; Martín M.; Nozal, M. y Bernal, L. 2009. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. *Toxicol. Let.*, 190: 91-95.
- Arcan-Hoy y Metcalfe, C. 2000. Hepatic micronuclei in brown bulheads (*Ameiurus nebulosus*) as a biomarker for exposure to genotoxic chemicals. *J. Great Lakes Res.*, 26 (4): 408-415.
- Astiz, M.; Alaniz, M. y Marra, C. 2009. The impact of simultaneous intoxication with agrochemicals on the antioxidant defense system in rat. *Pest. Biochem. Physiol.*, 94: 93-99.
- Ayllón, F.; Suciú, R., Gaphard, S.; Juanes, F. y Garcia-Vazquez, E. 2000. Conventional armament wastes induce micronuclei in wild brown trout *Salmo trutta*. *Mutat. Res.*, 470: 169–176.
- Ayoola, S. 2008. Histopathological effects of glyphosate on juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 4 (3): 362-367.

- Bagdonas, E.; Bukelskis, E. y Lazutka, J. 2003. Frequency of micronucleated eritrocytes in wild fish from natural freshwater bodies. *Ekologija*, 1: 67-71.
- Bardiene, J.; Dedonyte, V.; Rybakovas, A.; Andreikenaite, L. y Odd-Ketil, A. 2005. Induction of micronuclei in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) after treatment with bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether-47. *Ekologija*, 4: 1-7.
- Bihari, N.; Batel, R.; Jaksic, Z.; Muller, W.; Waldmann, P. y Zahn, R. 2002. Comparison between the comet assay and fast micromethod for measuring DNA damage in HeLa cells. *Croat. Chem. Act.*, 75 (3): 793-804.
- Bringolf, R.; Cope, W.; Eads, C.; Lazaro, P.; Barnhart, M. y Shea, D. 2007. Acute and chronic toxicity of technical-grade pesticides to glochidia and juveniles of freshwater mussels (Unionidae). *Environ. Toxicol. Chem.*, 26 (10): 2086-2093.
- Burger, M. y Fernández, S. 2004. Exposición al herbicida glifosato: aspectos clínicos toxicológicos. *Rev. Med. Uruguay*, 20: 202-207.
- Burton, G. y Landrum, P. 2003. Toxicity of sediments. En: *Encyclopedia of sediments and sedimentary rocks*. Middleton, G.; Church, M.; Corigilo, M.; Hardie, L. y Longstaffe, F. (eds). Kluwers Academy Publishers, Dordrecht. Págs 748-751.
- Cajaraville, M.; Bebianno, M.; 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.
- Campagna, A.; Fracácio, R.; Rodrigues, B.; Eler, M.; Verani, N. y Gaeta, L. 2008. Analyses of the sediment toxicity of Monjolinho river, São Carlos, São Paulo state, Brazil, using survey, growth and gill morphology of two fish species (*Danio rerio* and *Poecilia reticulata*). *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 51 (1): 193-201.

- Cavalcante, D.; Martinez, C. y Sofia, S. 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. [Mutat. Res., 655 \(1-2\)](#): 41-46.
- Cavas, T. y Könen, S. 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 1–6.
- Chaudhary, R.; Pandey, S.; Kushwaha, B.; Gaur, K. y Nagpure, N. 2006. Fish micronucleus assay: a sensitive tool for ecogenotoxicity studies. *J. Ecophysiol. Occup. Hlth.*, 6: 1-4.
- Chen, G. y White, P. 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutat. Res.*, 567: 151–225.
- Coughlan, B.; Hartl, M.; O'Reilly, S.; Sheehan, D.; Morthersill, C.; van Pelt, F.; O'Halloran, J. y O'Brien, N. 2002. Detecting genotoxicity using the comet assay following chronic exposure of manila clam *Tapes semidecussatus* to polluted estuarine sediments. *Mar. Pollut. Bull.*, 44 (12): 1359-1365.
- Di Giulio, R.; Benson, W.; Sanders, B. y Van Veld, P. 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. En: *Fundamentals of aquatic toxicology*. Rand, G. (ed). Taylor y Francis, Florida. Págs. 523-561.
- Dixon, D. y Wilson, J. 2000. Genetics and marine pollution. *Hidrobiología*, 420: 29-43.
- Donadío, M.; García, S.; Ghera, C.; Haas, A.; Larripa, I.; Marra, C.; Ricca, A.; Ronco, A. y Villaamil, E. 2009. Evaluación de la información científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente. Informe del Consejo Nacional de investigaciones científicas y técnicas (CONICET). Buenos Aires.
- EPA. 2003. “Glyphosate; pesticide tolerance”
www.federalregister.gov/articles/2003/06/18/03-15128/glyphosate-pesticide-

[tolerance](#). 05-10-2010

Eslava, P.; Ramírez, W. y Rondón, I. 2007. *Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos*. Universidad de los Llanos. Editorial Juan XXIII Villavicencio. Meta Colombia.

Fairbairn, D.; Olive, P. y O'Neill, K. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, 399: 37-59.

[Flammarion, P.](#); [Devaux, A.](#); [Nehls, S.](#); [Migeon, B.](#); [Noury, P.](#) y [Garric, J.](#) 2002. Multibiomarker responses in fish from the Moselle river (France). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 51 (2): 145-153.

Geffard, A.; Geffard, O.; His, E. y Amiard, J. 2002. Relationships between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 233: 131-142.

González, M. 2006. Geoquímica de los sedimentos superficiales del río Manzanares Estado Sucre. Venezuela. Trabajo de pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.

Grisolia, C.; Rivero, C.; Starling, F.; Da Silva, I.; Barbosa, A. y Dorea, J. 2009. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genet. Mol. Biol.*, 32 (1): 138-143.

Hafes, A. 2009. *Mugil cephalus* genome: a sensitive monitor for genotoxicity and cytotoxicity in aquatic environment *Aust. J. Basic & Appl. Sci.*, 3 (3): 2176-2187.

Hartl, M.; Coughlan, B.; Sheehan, D.; Mothersill, C.; van Pelt, F.; O'Reilly, S.; Heffron, J.; O'Halloran, J. y O'Brien, N. 2004. Implications of seasonal priming and reproductive activity on the interpretation of comet assay data derived from the clam, *Tapes semidecussatus* Reeves 1864, exposed to contaminated sediments. *Mar.*

Environ. Res., 57: 295–310.

Hartl, M.; Kilemade, M.; Sheehan, D.; Mothersill, C.; O'Halloran, J.; O'Brien, N. y van Pelt, F. 2007. Hepatic biomarkers of sediment-associated pollution in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Mar. Environ. Res.*, 64: 191–208.

Hartmann, A.; Agurell, E.; Beepers, C.; Brendler-Schwaab, S.; Burlinson, B.; Clay, P.; Collins, A.; Speit, G.; Thybaud, V. y Tice, R. 2003. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 18 (1): 45-51.

Hayes, W. y Laws, E. 1991 Handbook of pesticide toxicology. Academic Press. London.

Henaó, B.; Palacios, J. y Camargo, M. 2005. Evaluación genotóxica de los plaguicidas cipermetrina y diazinón en tilapia roja (*Oreochromis* sp.). *Actual. Biol.*, 27 (82): 43-55.

Jiraungkoorskul, W.; Upatham, S.; Kruatrachue, M.; Sahaphong, S.; Vichasri-Grams, S. y Pokethitiyook, P. 2002. Histopathological effects of roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Sci. Asia*, 28: 121-127.

Kaczewer, J. 2002. "Toxicología del glifosato: riesgos para la salud humana". www.produccion-animal.com.ar. 28-05-2010.

Kilemade, M.; Hartl, M.; Sheehan, D.; Mothersill, C.; van Pelt, F.; O'Halloran, J. y O'Brien, N. 2004. Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as measured by comet assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 44: 56-64.

Klobucar, G.; Stambuk, A.; Plavica, M.; Sertié, M.; Kutuzovic, B. y Hylland. K. 2010. Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology*, 19:77–84.

Könen, S. y Cavas, T. 2008. Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation Treflan using the piscine micronucleus test *Environ. Mol. Mutagen.*, 49 (6): 434-438.

- Kopjar, N.; Mustafic, P.; Zanella, D.; Buj, I.; Caleta, M.; Marcic, Z.; Milic, M.; Dolenc, Z. y Mrakovcic, M. 2008. Assessment of DNA integrity in erythrocytes of *Cobitis elongat* affected by water pollution: the alkaline comet assay study. *Folia Zool.*, 57 (1–2): 120–130.
- Laffon, B.; Aldao, I.; Pérez-Cadahía, B.; Pásaro, E. y Méndez, J. 2006. Primer paso en la evaluación de los efectos del fuel del Prestige sobre el medio ambiente marino: biodisponibilidad, bioacumulación y daño en el ADN. *Cienc. Mar.*, 32 (2B): 389–399.
- Lárez, C. 2007. Detección de daños en las membranas celulares y en el ADN de la guaraguara *Ancistrus brevifilis* (Eigenmann, 1920) del río Manzanares, estado Sucre, Venezuela. Trabajo de pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Latt, S. y Allen, J. 1977. *In vitro* and *in vivo* analysis of sister-chromatid exchange formation. En: *Handbook of mutagenicity test procedures*. Kilbey, B.; Legator, M.; Nichols, W. y Ramel, C. (eds). Elsevier, Amsterdam. Págs. 275-291.
- Lee, R. y Steinert, S. 2003. Use the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animal. *Mutat. Res.*, 544: 43-64.
- Lushchak, L.; Kubrak, O.; Storey, J.; Storey, K. y Lushchak, V. 2009. Low toxic herbicide roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*, 76: 932–937.
- Maldonado, A. 2003. Daños genéticos en la frontera de Ecuador por las fumigaciones del Plan Colombia. Informe de investigación.
- Mañas, F.; González, M.; García, H.; Weyers, I.; Vera, L.; Larripa, I.; Gorla, N. 2006. La genotoxicidad del herbicida glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micronúcleos en ratones tratados. *Theoria*, 15 (2): 53-60.

- Mañas, F.; Peralta, L.; Raviolo, J.; García H.; Weyers, A.; Ugnia, L.; González, M.; Larripa, I. y Gorla, N. 2009a. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetics tests. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 28: 37-41.
- Mañas, F.; Peralta, L.; Raviolo, J.; García H.; Weyers, A.; Ugnia, L.; González, M.; Larripa, I. y Gorla, N. 2009b. Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetics tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72: 834-837.
- Mañas, F. 2010. Genotoxicidad de glifosato y su principal metabolito AMPA cuantificado por los ensayos de aberraciones cromosómicas, micronúcleos y cometa. www.globalizate.org. 12-06-2010.
- Martínez, G. y Senior, W. 2001. Especiación de metales pesados (Cd, Zn, Cu y Cr) en el material en suspensión de la pluma del río Manzanares, Venezuela. *Interciencia*, 26 (2): 53-61.
- Martínez, G.; Senior, W. y Márquez, A. 2005. Distribución y especiación de metales pesados en el material en suspensión de las aguas superficiales de la pluma del Río Manzanares, Edo. Sucre, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanog. Venezuela, Univ. Oriente*, 44 (2): 75-87.
- Matsumoto, F. y Cólus, I. 2000. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genet. Mol. Biol.*, 23 (2): 489-492.
- Matsumoto, S.; Mantovani, M.; Ariza, M.; Dias, A.; Fonseca, I. y Marin-Morales, M. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genet. Mol. Biol.*, 29 (1): 148-158.

- Mersch, J.; Beauvais, M. y Nagel, P. 1996. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutat. Res.*, 371: 47-55.
- Milowska, K.; Gabryelak, T.; Dudala, J.; Labieniec, M. y Slobozhanina, E. 2003. Biological activity of pentachlorophenol on the digestive gland cells of the freshwater Mussel *Unio tumidus*. *Z. Naturforsch.*, 58c: 867-872.
- Mitchelmore, C. y Chipman, J. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.*, 399: 135-147.
- Nacci, D.; Cayula, S. y Jackim, E. 1996. Detecction of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquat. Toxocol.*, 35: 197-210.
- Olive, P.; Wlodek, D.; Durand, R. y Banáth, J. 1992. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp. Cell. Res.*, 198: 259-267.
- Ostling, O. y Johanson, K. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual cells. *Biochem. Biophysl. Res. Communic.*, 123: 291-298.
- Özcan, O.; Gül, S.; Keles, O.; Aksu, P.; Kaya, Ö. y Nur, G. 2009. The investigation of the mutagenic activity of Kars river sediements on *Orthrias angore* (Steindachner, 1897). *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 15 (1): 35-40.
- Palencia, P. 1995. Clave identificatoria para los peces de la cuenca alta de los ríos Uribante y Doradas, edo. Táchira, Venezuela. *Rev. Ecol. Lat. Am.*, 3 (1-3): 01-04.
- Palma, P. 2005. Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el río Traiguen. Trabajo de pregrado. Facultad de Ciencias, Universidad Católica de Temuco, Temuco.

- Prasad, S.; Srivastava, S.; Singh, M. y Shukla, Y. 2009. Clastogenic effects of glyphosate in bone marrow cells of swiss albino mice. *J. Toxicol.*, 1-6.
- Prieto, F.; Báez, O.; Scout, W.; Gaytán, J. y Zúñiga, A. 2007. Toxicidad y teratogénesis por arsénico en aguas en el pez cebra (*Danio reiro*). *Rev. Toxicol.*, 24: 18-22.
- Porto, J.; Araujo, C. y Ferdberg, E. 2005. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environ. Res.*, 97: 287-292.
- Ramírez, W.; Rondón, I. y Eslava, P. 2003. Efectos del glifosato (GP) con énfasis en organismos acuáticos. (Revisión de literatura). *Orinoquia*, 7 (1-2): 70-100.
- Rigonato, J.; Mantovani, M. y Quinzani, B. 2005. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. *Genet. Mol. Biol.*, 28 (3): 464-468.
- Ruíz, L.; Salazar, S.; Pérez, J. y Alfonsi, C. 2005. Diversidad íctica del sistema hidrográfico Río Manzanares, estado Sucre, Venezuela. *Bol. Centro Investig. Biol.*, 39 (2): 91-107.
- Sadiq, M. 1992. *Toxic metal chemistry in marine environments*. Environmental science and pollution control. Serie. 1. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Sarkar, A.; Ray, D.; Shrivastava, A. y Sarker, S. 2006. Molecular biomarkers: their significance and application marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*, 15 (4): 333-340.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.*, 31: 9-15.
- Senior, W.; López, F. y Fermín, I. 2003. Principales fuentes contaminación del río Manzanares, Venezuela. Informe técnico.

- Senior, W.; Fermín, I. y Mata, F. 2004. Diagnóstico ambiental y participación comunitaria para el control de la contaminación del Río Manzanares, estado Sucre, Venezuela. Informe técnico.
- Silbergeld, E. 1998. Toxicología. En: *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*. Finklea, J.; Messite, J.; Coppée, G.; Sauter, S.; Hunt, V.; Spiegel, J.; Kraus, R.; Soskolne, C.; Laurig, W.; Terracini, B. y Myers, M. (eds). Ministerio del Trabajo y Asuntos Sociales, España. Págs. 1-84.
- Singh, N.; McCoy, M.; Tice, R. y Schneider, E. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.*, 175: 184-191.
- Siu, W.; Mak, E.; Cao, J.; de Luca-Abbott, S.; Richardson, B. y Lam, P. 2004. Micronucleus induction in gill cells of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23 (5): 1317–1325.
- Solomon, K.; Anadón, A.; Cerdeira, A.; Marshall, J. y Sanín, N. 2005. Estudio de los efectos del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Informe preparado para la Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD), División de la Organización de los Estados Americanos (OEA) Washington, D.C., Estados Unidos de América.
- Sotil, G.; Alvis, R.; Francia, J. y Shiga, B. 2007. Aplicación de dos biomarcadores para el análisis de lesiones en el DNA de bivalvos marinos. *Rev. Peru. Biol.*, 13 (3): 249-253.
- Srut, M.; Stambuk, A.; Pavlica, M. y Klobučar, G. 2010. Cage exposure of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) for *in situ* assessment of pollution-related genotoxicity. *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 61: 29-36.

- Stephan, C.1971. Methods for calauting LC₅₀. En Aquatic toxicology and Hazard evaluation. Mayer, F. y Hamelink, J. (eds) American Society for Testing Materials, Philadelphia. Págs. 48-64.
- Talapatra, S.; Ganguly, P.; Mukhopadhyay, A. y Banerjee, S. 2006. Assessment of genetic biomarkers with special referent to micronucleated and binucleated erythrocytes in two fish species grown at industrial vicinity of termal power plants, Kolkata, India. *Asian J. Water, Environ. Pollut.*, 4 (1): 139-144.
- Taleb, Z.; Benghali, S.; Kaddour, A. y Boutiba, Z. 2007. Monitoring the biological effects of pollution on the Algerian west coast using mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Oceanologia*, 49 (4): 543–564.
- Tice, R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.-C. y Sasaki, Y. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35:206-221.
- Torres-Bugarín, O.; Zavala-Aguirre, J.; Gómez-Rubio, P.; Buelna-Osben, H.; Zúñiga-González, G. y García-Ulloa, M. 2007. Especies de peces con potencial como bioindicadoras de genotoxicidad en el lago “La Alberca”, Michoacán, México. *Hidrobiológica*, 17 (1): 75-81.
- Ulupinar, M. y Okumus, I. 2002. Detection of mutagenic-carcinogenic pollutants in aquatic systems using cytogenetic methods in fish. *Turk. J. Zool.*, 26: 141-148.
- Watson, J.; Baker, T.; Bell, S.; Gann, A.; Levine, R. y Losick, R. 2006. *Biología molecular del gen*. 5^{ta} edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid España.
- Wilson, J.; Pascoe, P.; Parry, J. y Dixon, D. 1998. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutat. Res.*, 399: 87-95.

WHO. 1994. "International programme on chemical safety. Glyphosate". Environmental Health Criteria 159. World Health Organization. Ginebra.

[Winter, M.](#); [Day, N.](#); [Hayes, R.](#); [Taylor, E.](#); [Butler, P.](#) y [Chipman, J.](#) 2004. DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. [Mutat. Res.](#), 552: 163-75.

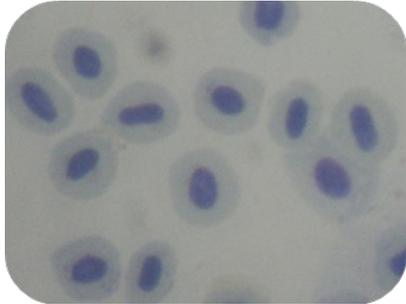
Xu, L.; Zheng, G.; Lam, P. y Richardson, B. 1999. Relationship between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA adducts in green-lipped mussels (*Perna viridis*). *Ecotoxicology*, 8: 73-82.

Zalacaín, M.; Sierrasesúмага, L. y Patiño, A. 2005. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *An. Sist. Sanit. Navar.*, 28 (2): 227-236.

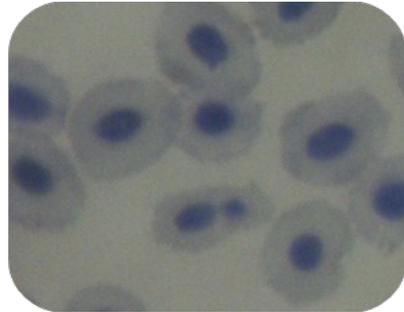
Zhu, L.; Huang, Y. y Liu, G. 2005. Using DNA damage to monitor water environment. *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 23 (3): 340-348.

Zuleta, M. y Meléndez, I. 2001. Genotóxicos y carcinógenos en aguas. *Actual. Biol.*, 23 (74): 83-93.

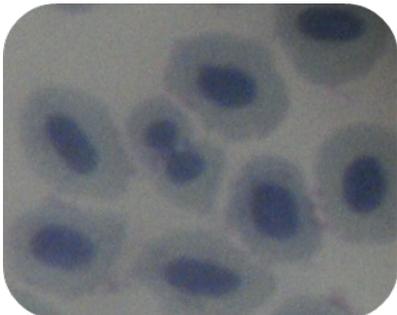
ANEXOS



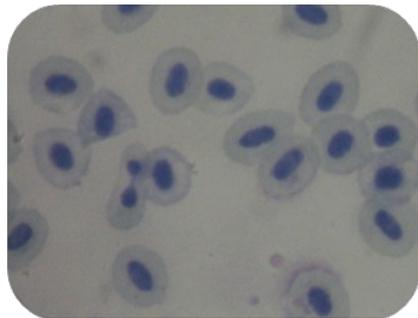
(a)



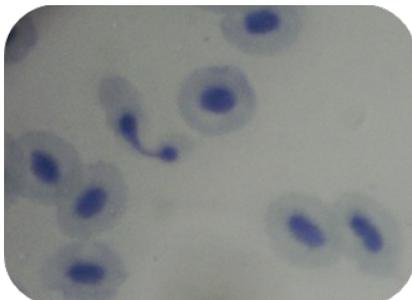
(b)



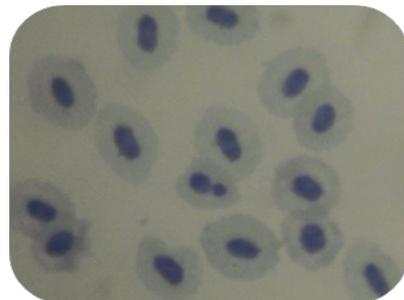
(c)



(d)

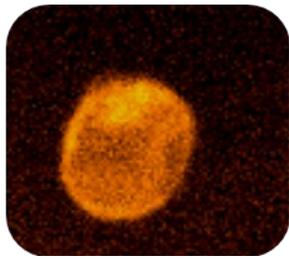


(f)

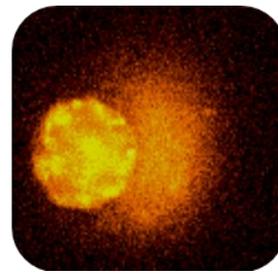


(g)

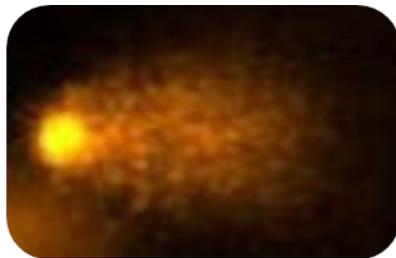
Anexo 1.- Imágenes que muestran tipos células encontradas por medio del ensayo de Micronúcleos: (a) células control; (b) célula micronucleada; (c y d) células binucleadas; (f y g) puentes nucleares.



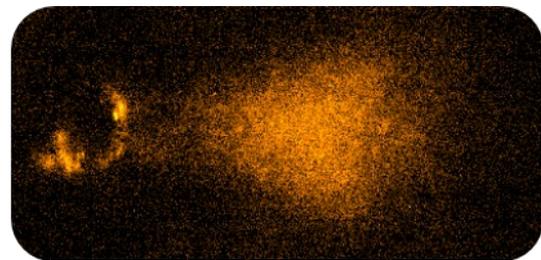
Tipo 0



Tipo 1



Tipo 2



Tipo 3

Anexo 2. Tipos de cometas que representan daños a nivel de ADN (tipo 0 representa un núcleo intacto, tipo 1 muestra una lesión leve, tipo 2 sugiere una lesión media y la tipo 3 representa el máximo daño).

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	GENOTOXICIDAD EN CÉLULAS SANGUÍNEAS DE LA GUARAGUARA <i>Ancistrus brevifilis</i> (EIGENMANN, 1920), BAJO CONDICIONES CONTROLADAS Y EN CONDICIONES NATURALES EN DOS LOCALIDADES DEL RÍO MANZANARES, ESTADO SUCRE, VENEZUELA. (Modalidad: Investigación)
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Lárez Carol	CVLAC	14285478
	e-mail	carolyova@hotmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Río Manzanares
Genotoxicidad
<i>Ancistrus brevifilis</i>
Biomarcadores

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
BIOLOGÍA APLICADA	ECOTOXICOLOGÍA

Resumen (abstract):

La especie *Ancistrus brevifilis* (Siluriformes: Loricariidae) conocida localmente como guaraguara, es un pez ampliamente distribuido en los ecosistemas dulceacuícolas de la región nororiental de Venezuela. Esta especie habita y se alimenta en el fondo de los ríos donde se acumula gran cantidad de contaminantes; por lo tanto, se usó como organismo centinela de contaminación acuática. Se evaluó el efecto genotóxico que sobre las células sanguíneas de *A. brevifilis* tienen los contaminantes provenientes de la actividad agrícola presentes en el río Manzanares, a través de: un ensayo de toxicidad aguda con dosis subletales de glifosato (0; 1; 3 y 5 ppm), un ensayo de toxicidad crónica por exposición a sedimentos y por detección *in situ* en el campo en las localidades de Yoraco y Guasdua. Se determinó la viabilidad celular y se estimaron las lesiones a nivel de ADN a través de las técnicas de micronúcleos y ensayo cometa. El promedio del porcentaje de células viables estuvo en un rango comprendido desde 88,67 hasta 91,96%. En el ensayo de toxicidad aguda con la dosis más alta utilizada de glifosato se encontró la mayor cantidad de células micronucleadas (K-W=12,64; p<0,01) y aberraciones nucleares (K-W=8,30 p<0,05); en la genotoxicidad evaluada por el ensayo cometa, se hallaron diferencias altamente significativas por tipo de cometa y longitud de la cola del mismo (K-W=42,60; p<0,001 y K-W=42,56; p< 0,001) respecto al grupo control. En cuanto al ensayo de toxicidad crónica con sedimentos, los micronúcleos resultaron significativos por tiempo de exposición (K-W=8,18; p<0,01); mientras que, las alteraciones nucleares fueron significativas tanto para tiempo de exposición como para el tipo de sedimentos (K-W=8,47; p<0,01 y K-W=13,18; p<0,01); por su parte se registraron también diferencias significativas en el ensayo cometa para los factores tiempo de exposición (K-W=18,42; p<0,001) y tipo de sedimentos (K-W=20,16;p<0,001). En la detección *in situ* se encontraron diferencias significativas entre los promedios de micronúcleos (K-S=1,58; p<0,05), tipo de cometa (K-S=9,22; p<0,001) y longitud de la cola de los mismos (K-S=9,22; p<0,001) para las localidades de Yoraco y Guasdua. Si bien, el glifosato tiene una actividad biológica de corta duración en suelos y agua, no se biomagnifica ni se mueve a lo largo de la cadena alimenticia, y no se filtra a las aguas subterráneas desde el suelo; estos resultados demuestran efectos adversos en la especie *A. brevifilis*. En los ensayos de laboratorio, los sedimentos del río Manzanares causaron daños en el ADN del organismo en estudio dependiente del tiempo de exposición; como es el caso, de micronúcleos y cometas; mientras que, en la detección *in situ* los daños encontrados en el material genético de la guaraguara fueron mínimos, comparados con los resultados obtenidos en el laboratorio, a pesar de las diferencias halladas entre las localidades de Yoraco y Guasdua. La sensibilidad del ensayo cometa y test de micronúcleos varió con las condiciones de experimentación.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
ALFONSI CARMEN	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	5880562
	e-mail	calfonsir@hotmail.com
	e-mail	
MARACANO LEIDA	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8219437
	e-mail	leimar0501@gmail.com
	e-mail	
NUSETTI OSMAR	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	624594
	e-mail	onusetti@yahoo.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año **Mes** **Día**

2011	04	28
-------------	-----------	-----------

Lenguaje: spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
P.G-larezCarol.doc	Application/Word

Alcance:

Espacial : Nacional (Opcional)

Temporal: Temporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Magíster Scientiarum en Biología Aplicada

Nivel Asociado con el Trabajo: Post Grado

Área de Estudio: Biología Aplicada

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CU N° 0975

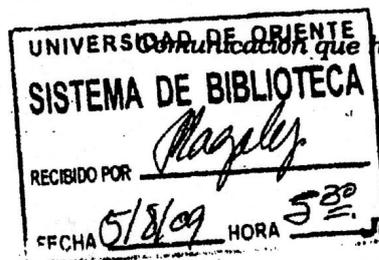
Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLAÑOS CUNVELO
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

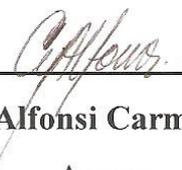
Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización”.



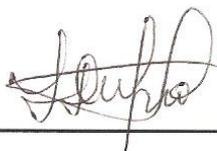
Lárez Carol

Autor



Alfonsi Carmen

Asesor



Marcano Leida

Jurado Principal



Nusetti Osmar

Jurado Principal

Coordinación de Post Grado en Biología Aplicada

