

199



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA
INVESTIGAR GENOTOXICIDAD EN UN INVERTEBRADO
ACUATICO DE IMPORTANCIA ECONOMICA,
EL ACOCIL *Procambarus clarkii*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A:

EMILIA ELENA DE LA SIENRA SERVIN

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

2001



294312

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION DE CIENCIAS



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA INVESTIGAR GENOTOXICIDAD EN UN INVERTEBRADO ACUÁTICO DE IMPORTANCIA ECONOMICA, EL ACOCIL: *Procambarus clarkii*.
realizado por Emilia Elena de la Sienna Servín

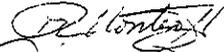
con número de cuenta 9561814-0 , pasante de la carrera de Biología

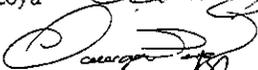
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

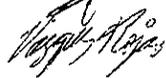
Director de Tesis

Propietario Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte 

Propietario Dra. Regina Dorinda Montero Montoya 

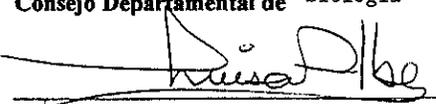
Propietario Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez 

Suplente M. en C. Juan Carlos Gaytán Oyarzún 

Suplente M. en C. Ignacio Mauro Vázquez Rojas 

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología



Dra. Luisa Albarina Alba Lois



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL
PARA INVESTIGAR GENOTOXICIDAD EN UN
INVERTEBRADO ACUÁTICO DE IMPORTANCIA
ECONÓMICA, EL ACOCIL *Procambarus clarkii*.

El presente proyecto de investigación se realizó en el Departamento de Genética y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte y con el patrocinio parcial del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM (PAPIIT - IN207196). También se contó con el apoyo de la Dra. María Aurora Armienta Hernández del Laboratorio de Química Analítica del Instituto de Geofísica de la UNAM para realizar las determinaciones de cromo.

*A mi mamá, Polo, la abuela y el tatielo por el
caríño tan grande y el apoyo infinito que
siempre me han hecho sentir*

A toda la familia por ser eso, mi familia

*A Roberto por haber compartido conmigo la
facultad y el desarrollo de este trabajo, además
de haberme robado el corazón*

*A todos los amigos que, en su momento, han
formado parte esencial en mi vida*

*A Maricha por su confianza, por sus
conocimientos, por su apoyo y por su invaluable
amistad. Gracias por haber creído en mí.*

*A Paty Ramírez y toda la gente del laboratorio
por su ayuda incondicional y por los
momentos compartidos*

*A mis maestros Adriana Muñoz y Juan Carlos
Gaytán por contagiarme el interés en la
ecotoxicología*

*A Julio Prieto, la Dra. Armienta Regina, Nacho y
la Dra. Cecilia por el apoyo que tan amablemente
me brindaron*

*Pero sobre todo, agradezco y dedico este trabajo
a quienes les costó la vida el que yo pudiera
realizarlo.*

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| 1. INTRODUCCIÓN: | |
| a) La ecotoxicología como nueva disciplina | 7 |
| b) La ecotoxicología y la contaminación del agua | 10 |
| c) El cromo hexavalente como contaminante acuático | 13 |
| d) El acocil <i>Procambarus clarkii</i> como posible organismo biomonitor | 17 |
| 2. JUSTIFICACIÓN: | |
| a) Hipótesis | 27 |
| b) Objetivos | 27 |
| 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA: | |
| a) Determinación de micronúcleos en células de hemolinfa | 28 |
| b) Determinación de complejos DNA-proteínas en células de branquias y hepatopáncreas | 29 |
| c) Determinación del cromo presente en las branquias | 29 |
| d) Análisis estadístico | 30 |
| 4. RESULTADOS | 31 |
| 5. DISCUSIÓN | 35 |
| 6. CONCLUSIONES | 37 |
| 7. PERSPECTIVAS | 38 |
| 8. ANEXO | 39 |
| 9. REFERENCIAS | 40 |

RESUMEN

El monitoreo de la contaminación ambiental puede realizarse básicamente a través de un análisis químico; sin embargo, debe ser reforzado con una aproximación biológica de los efectos que las sustancias tóxicas ejercen sobre los ecosistemas. En este sentido, se les denomina organismos indicadores o biomonitores a los sistemas biológicos comúnmente utilizados, y biomarcadores a los cambios que los organismos sufren por exposición a contaminantes ambientales. Los biomarcadores genotóxicos son de especial interés porque la inducción de mutaciones genéticas y de aberraciones cromosómicas es un proceso fundamental en el desarrollo de las enfermedades hereditarias, en la pérdida de la capacidad reproductiva y en la iniciación del cáncer.

La contaminación del agua es uno de los problemas más importantes en el mundo entero, no sólo por los problemas de salud humana que genera sino también por el daño ecológico que esto implica. Entre sus contaminantes principales encontramos al cromo hexavalente, compuesto genotóxico ampliamente utilizado en diversos procesos industriales (cromado de metales, curtido de pieles, manufactura de pigmentos, etc.).

El objetivo principal de esta investigación es desarrollar un modelo experimental usando al acocil *Procambarus clarkii* como un organismo biomonitor que permita evaluar la presencia de compuestos genotóxicos en cuerpos de agua dulce contaminada.

Se utilizaron dos bioensayos diferentes: la presencia de micronúcleos en las células de la hemolinfa y la formación de complejos DNA-proteínas en las células del hepatopáncreas y de las branquias. Los animales fueron tratados con diferentes concentraciones de cromo hexavalente (0, 200 y 400 $\mu\text{g Cr/L}$). También se determinó la presencia de este metal en las branquias del acocil (biomarcador de exposición) en un espectrofotómetro de absorción atómica.

Los resultados indican que el cromo hexavalente es genotóxico para el acocil *P. clarkii* pues además de que la frecuencia de micronúcleos incrementó al aumentar la concentración de exposición, se correlacionó linealmente con la cantidad de cromo incorporado en las branquias del acocil. No se observó inducción de complejos DNA-proteínas.

La prueba de micronúcleos en los hemocitos del acocil *P. clarkii* puede ser potencialmente utilizada para evaluar la presencia de compuestos genotóxicos similares al cromo hexavalente en cuerpos de agua dulce contaminada.

ABSTRACT

Monitoring environmental pollution can be done mostly based on chemical analysis however it should be completed with a biological approach of the effects of chemicals upon ecosystems and their magnitude. In this sense, the biological test systems commonly used are called biomonitors, and the changes that the organisms suffer for exhibition to environmental pollutants are called biomarkers. The genotoxic biomarkers are of special interest because the induction of gene mutations and chromosome aberrations are considered of great importance for heritable diseases development, reproductive loss or cancer initiation.

Water pollution is one of the most important problems in the whole world, not only because of human health problems, but also because the ecological damage that it implicates. Among their main pollutants we found the hexavalent chromium, a genotoxic compound thoroughly used in diverse industrial processes (metal surface plating, leather tanning, paint pigments manufacture, etc.).

The main objective of this research is to develop an experimental model using the crayfish *Procambarus clarkii* as a biomonitor of genotoxic compounds in polluted freshwater.

Two different bioassays were used: the presence of micronucleus in the haemolymph cells and the DNA-proteins complexes in the digestive gland and gills cells. Animals were treated with different concentrations of hexavalent chromium (0, 200 and 400 $\mu\text{g Cr/L}$). The presence of this metal in the gills of the crayfish was also determined (biomarker of exposure) with an atomic absorption spectrophotometer.

The results indicated that the hexavalent chromium is genotoxic for the *P. clarkii* because the micronucleus frequency increased while increasing the exposure concentration, and because it correlated linearly with the amount of chromium incorporated in the gills. We did not observed the induction of DNA-proteins complexes.

The micronucleus test in the haemocytes of the crayfish *P. clarkii* could be potentially used to evaluate the presence of genotoxic compounds similar to the hexavalent chromium in polluted freshwater bodies.

1. INTRODUCCIÓN

a) La ecotoxicología como nueva disciplina.

A finales de la Segunda Guerra Mundial se dio un aumento casi exponencial en la industrialización de muchos países implicando una elevada producción de sustancias químicas adversas para el medio ambiente. Desafortunadamente, " los años de posguerra y la década de los 50's se caracterizaron por la actitud común en los países industrializados de que la humanidad era dueña absoluta del mundo y, con la nueva tecnología que estaba desarrollando, podía hacer en él y de él lo que mejor conviniera a sus intereses". La opinión general aceptaba que las actividades industriales causaban contaminación, pero también establecía que ésta era un efecto no significativo en comparación con los beneficios del desarrollo económico y el bienestar que se estaba obteniendo, "sus efectos estaban limitados a una simple incomodidad o un trastorno estético que sólo afectaba a grupos marginados por su cultura, su ubicación geográfica o por razones económicas" (1).

Años más tarde, el inevitable incremento en la frecuencia y gravedad de los casos de enfermedad y muerte producidos por la contaminación ambiental despertaron la atención inmediata, y real, del gobierno y la población general de los países afectados (Estados Unidos, Inglaterra, Japón, Turquía, por ejemplo). Poco a poco se empezó a comprender que la contaminación ambiental va más allá de un malestar momentáneo o estético con efectos remotos en tiempo y espacio y se entendió que, por múltiples factores (disponibilidad y calidad del alimento, el agua, el aire, etc.), se puede afectar negativamente la salud, la calidad de vida y el futuro de la humanidad. Afortunadamente empezó a generarse la conciencia creciente de que, por lo general, los efectos de la contaminación ambiental no son inmediatos, toma tiempo detectarlos y cuando esto sucede, el remediarlos es muy costoso o imposible (1).

Por todo lo anterior se dice que al terminar la década de los sesentas apareció una nueva disciplina dentro de las ciencias biológicas que representa el estudio de los efectos que los agentes contaminantes (toxicología) ejercen sobre los integrantes de un ecosistema (ecología), por lo que se le nombró **toxicología ambiental** ó **ecotoxicología**. Esta nueva rama surgió de la intensa preocupación por evaluar los riesgos ambientales más que los de la salud humana, pues además de analizar el impacto que ejercen las sustancias químicas en el *Homo sapiens* también se analizan los efectos en otras especies distintas. Los objetivos principales de la ecotoxicología son entonces (33; 62):

- o Identificar los agentes potencialmente tóxicos a los que están sometidos los seres vivos en su hábitat natural.
- o Cuantificar los índices de exposición.
- o Caracterizar los efectos tóxicos que tales agentes producen en los habitantes del ecosistema.
- o Correlacionar los índices de exposición con la toxicidad cuantificada.
- o Proporcionar las bases científicas para el establecimiento de normas que ayuden a prevenir el daño ecológico.

En términos muy generales se puede decir que la ecotoxicología estudia los efectos que producen los agentes tóxicos en un ecosistema (Fig. 1) (62).

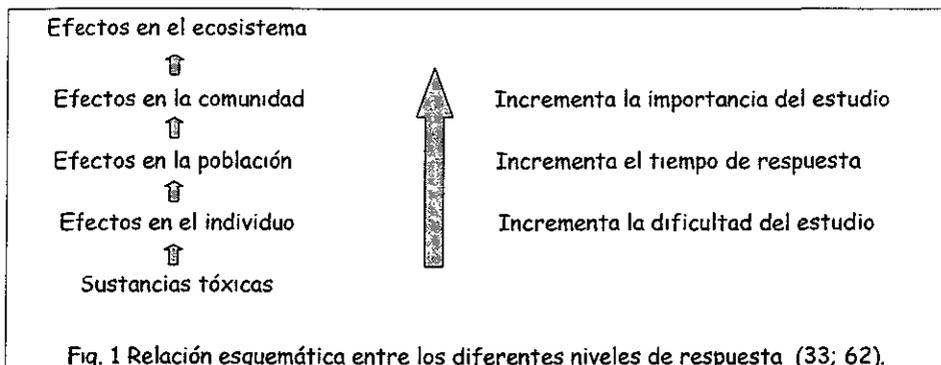


Fig. 1 Relación esquemática entre los diferentes niveles de respuesta (33; 62).

Cabe mencionar que la ecotoxicología es una ciencia interdisciplinaria donde participan diversos sectores del conocimiento, por ejemplo, la química analítica que nos proporciona información sobre concentraciones, dosis y comportamiento de las sustancias; la genética y la biología molecular que nos permiten describir los efectos toxicológicos a nivel molecular; la bioquímica y la fisiología, que investigan tales efectos pero sobre el funcionamiento del organismo; la ecología que permite interpretar las alteraciones poblacionales, comunitarias y del ecosistema, entre otras. Esto implica que el efecto que ejercen los químicos sobre los seres vivos puede analizarse desde diversos enfoques, por lo que existe una gran variedad de estrategias metodológicas que pueden ser aplicables en los estudios de ecotoxicología. Todas se incluyen en la siguiente clasificación, basada en el lugar de estudio, en la cantidad de especies involucradas y en la duración de la exposición (Fig. 2) (33).

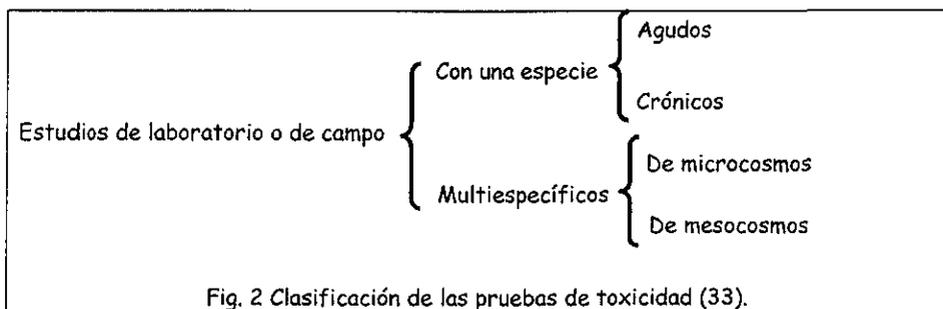


Fig. 2 Clasificación de las pruebas de toxicidad (33).

Los estudios ecotoxicológicos pueden realizarse tanto en el laboratorio, para hacer investigación básica, como en el campo directamente, para hacer investigación aplicada, aunque es importante mencionar que los estudios que se realizan en el campo son más complejos que los del laboratorio porque generalmente incluyen diferentes niveles de organización biológica y diversas variables como las condiciones climáticas, las espaciales y las evolutivas (33).

En las pruebas agudas se investiga el efecto de los tóxicos en una sola especie y en un corto periodo de tiempo en relación al ciclo de vida del organismo en cuestión, sirven para investigar los efectos inmediatos. Las pruebas crónicas también estudian los efectos tóxicos que se presentan en una sola especie pero durante una exposición más prolongada, por ejemplo, para evaluar cómo se ve afectada la tasa reproductiva (33).

Las pruebas multiespecíficas, como su nombre lo indica, incluyen la utilización de dos o más especies y están diseñadas de tal modo que todas puedan interactuar. Las pruebas de microcosmos incluyen la participación de pocas especies (no se han establecido los parámetros de cantidad) y generalmente del mismo nivel trófico, investigan el efecto de los tóxicos sobre fenómenos como el de competencia y generalmente se realizan en el laboratorio. Las pruebas de mesocosmos implican la utilización de varias especies y, generalmente, de diferente nivel trófico por lo que permiten la investigación de los efectos tóxicos sobre fenómenos como la relación presa-depredador, por lo regular se realizan en el campo (33).

Las especies utilizadas en los estudios de ecotoxicología se denominan **organismos biomonitores** pues son sistemas biológicos capaces de proporcionar información sobre la salud del ecosistema (10; 33), indican efectos biológicos más que cantidades reales del contaminante. Sus características principales son (33; 42):

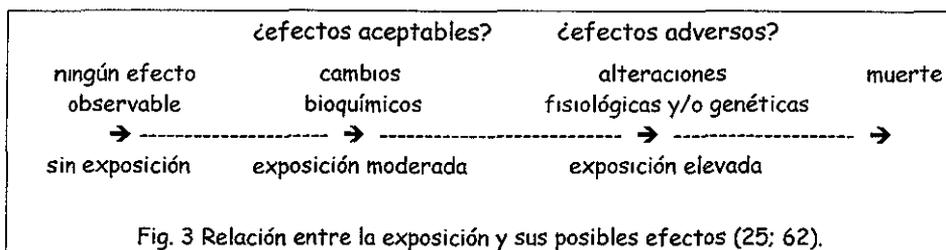
- o Fáciles de coleccionar e identificar.
- o De tamaño conveniente según el tipo de estudio.
- o Sedentarios en la mayoría de su ciclo de vida.
- o Sensibles al tóxico.
- o Óptimos para el trabajo de laboratorio.
- o De interés científico y económico.
- o Que la edad sea fácil de determinar.

Cabe mencionar que los **organismos centinela** son organismos biomonitores que habitan de manera natural en el ecosistema a evaluar, manifiestan los efectos del agente contaminante en su propio hábitat pues representan a la población natural. Por lo que, además de las características anteriores, debe estar bien distribuido y en abundancia. La ventaja principal de los organismos centinela es que permiten realizar monitoreos *in situ* (33).

Por otro lado, aunque la importancia del estudio ecotoxicológico aumenta cuando se evalúa a más de una sustancia química, esto es más complicado porque también aumentan el tiempo de respuesta y la dificultad para determinar al agente causal, ya que se deben considerar las interacciones físicas y químicas entre los distintos materiales en cuestión, la manera en que se metaboliza cada uno, los diferentes efectos que propician, etc (57).

Pero aún limitándonos a trabajar con un solo organismo y una sustancia única, la ecotoxicología abarca una gama muy amplia de efectos tóxicos pues, citando al médico y alquimista alemán Teofrasto Paracelso (1490-1541), "la dosis hace al veneno"; es decir, que si no hay dosis no hay efecto, y que a medida que la dosis incrementa, aparecen diferentes alteraciones que van desde cambios bioquímicos y fisiológicos que pasarían

desapercibidos de no contar con pruebas especiales para detectarlos en fluidos, tejidos u órganos corporales, hasta cambios genéticos que no necesariamente son aparentes sin el empleo de equipo y técnicas apropiados; e incluso, hasta la muerte. En pocas palabras, dependiendo de la dosis a la que se expongan los organismos, será el efecto (Fig. 3) (25).



Los efectos tóxicos también se conocen como **biomarcadores** y pueden definirse como las respuestas biológicas que los seres vivos manifiestan al estar expuestos a la contaminación ambiental. Son alteraciones provocadas por agentes contaminantes que se presentan en uno o más de los diferentes niveles de organización biológica, por ejemplo, a nivel individual puede variar el número, la estructura y/o la función de una molécula; a nivel poblacional puede variar la tasa de reproducción; y a nivel de la comunidad o del ecosistema puede variar la diversidad de las especies (33; 62).

Existen diferentes formas de clasificar a los biomarcadores, sin embargo, la más común implica separarlos en **biomarcadores de exposición** y **biomarcadores de efecto**. Los de exposición indican la exposición a la que está sometida el organismo sin dar información contundente sobre los efectos adversos, y los de efecto son los que demuestran el efecto adverso (tóxico) que presenta el organismo (62).

Una vez elegida la prueba, la(s) especie(s), la(s) sustancia(s) y los posibles biomarcadores, el estudio ecotoxicológico deberá abarcar las siguientes actividades (33; 57):

- Evaluar la magnitud y la vía de exposición.
- Identificar los efectos adversos.
- Establecer la relación entre la exposición y los efectos observados.
- Analizar los mecanismos de acción.
- Evaluar la reversibilidad de la respuesta tóxica.
- Considerar los factores que puedan modificar la toxicidad, por ejemplo, la especie, la edad, el sexo, el estado nutricional, la duración y las características de la exposición, las condiciones ambientales etc.
- Extrapolar los resultados a niveles superiores de organización biológica.

b) La ecotoxicología y la contaminación del agua.

El agua es un componente esencial para la vida pues además de haber catalizado su origen, la mayoría de las reacciones metabólicas se dan en su presencia y se presenta en un alto porcentaje en la constitución de los seres vivos. Es un recurso renovable que se recicla una y otra vez de manera natural a través del llamado ciclo del agua ó ciclo hidrológico, donde el agua se mueve constantemente desde la tierra, los mares y los ríos

hasta la atmósfera por evaporación para luego regresar a la superficie terrestre por precipitación (Fig. 4) (20: 51).

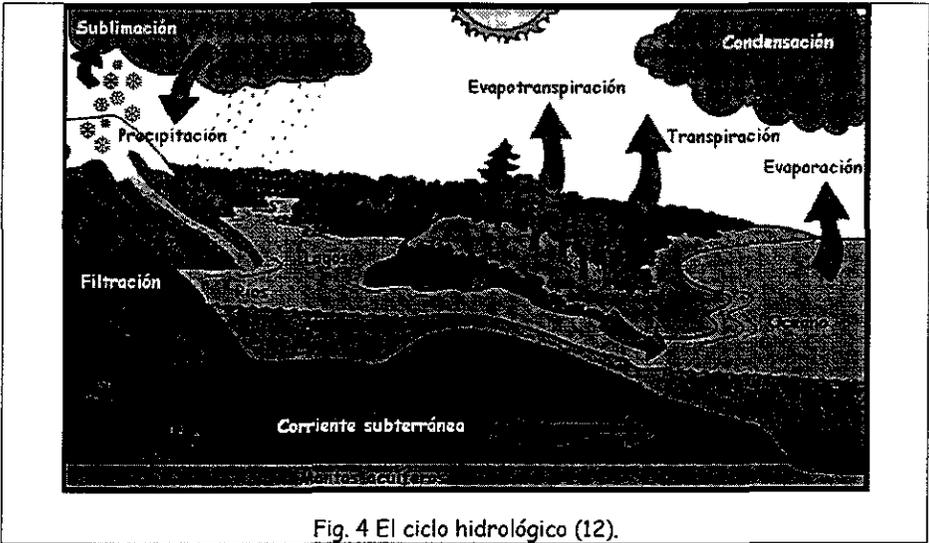
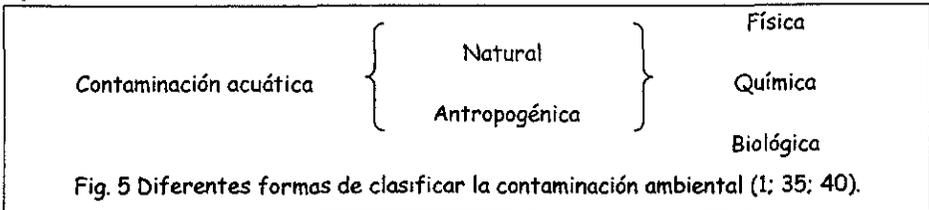


Fig. 4 El ciclo hidrológico (12).

Aproximadamente 300 Km³ de agua precipitan cada día y, aunque casi 2/3 partes se reevaporan inmediatamente, el 1/3 restante fluye hacia los ríos y los mares de todo el mundo generando a su paso lagos y lagunas, o depositándose en diques y presas, en el suelo como humedad, o en almacenamientos subterráneos denominados mantos acuíferos. El flujo de agua, sobre y por debajo de la corteza terrestre, puede aumentar o disminuir dependiendo de las condiciones ambientales, pues incrementa en tiempo de lluvias o deshielos y disminuye en épocas de sequía; sin embargo, su importancia radica en que tiene la capacidad de arrastrar y depositar sustancias esenciales para el ecosistema pudiendo hacer lo mismo con agentes contaminantes (20: 29; 51).

Se dice que el agua está contaminada cuando no es apta para el desarrollo normal de los seres vivos que la habitan, para el consumo humano, para usos recreativos o para alguna aplicación industrial. El agua contaminada es dañina para los seres vivos e inadecuada para cualquier uso benéfico (4).

La **contaminación acuática** puede ser clasificada dependiendo de la fuente de emisión o del tipo de contaminante (Fig. 5).



Dentro de las fuentes naturales de contaminación acuática están la erosión del suelo, las inundaciones por fuertes lluvias, erupciones volcánicas, introducción de agua salada, presencia de bacterias, virus, protozoarios, etc (35). En términos generales, la contaminación de origen natural está limitada en espacio y tiempo ya que suele estar asociada a circunstancias específicas; además, los contaminantes (algunos metales y elementos radiactivos) son de origen natural y con facilidad se reintegran a los ciclos biogeoquímicos del lugar dispersándose o degradándose (1). Las fuentes naturales de contaminación no provocan concentraciones altas de contaminación, excepto en algunos lugares muy concretos (35).

En cambio, la contaminación acuática procedente de **fuentes antropogénicas** ha producido efectos y alteraciones en los sistemas naturales que pueden clasificarse como reversibles o irreversibles, temporales o de carácter permanente, inmediatos o de larga gestación y maduración, visibles a menudo pero no fácilmente perceptibles en la mayoría de los casos, a veces despreciables pero muchas veces catastróficos y siempre negativos (35; 40). En la actualidad, sin duda, es mucho más importante que la contaminación provocada por fuentes naturales pues se presenta en una gran variedad de ecosistemas y, en términos generales, es mucho más peligrosa. Implica la entrada de sustancias naturales en cantidades que rebasan la homeostasis de los seres vivos y los propios mecanismos naturales de degradación, o bien, la entrada de sustancias sintéticas (xenobióticas) para las que estos mecanismos no existen (1). Son cuatro los focos principales de contaminación antropogénica (35):

1. La industria. Aunque existen diferentes tipos de industrias y cada una produce residuos diferentes (metales, materia orgánica, sustancias químicas, etc.) no todas tienen sistemas eficientes de depuración de aguas, pues en muchos países no se respetan las normas o éstas no existen, y la contaminación del agua por residuos industriales es una práctica común.
2. Los vertederos urbanos. Los alcantarillados arrastran todo tipo de sustancias como sales, sólidos en suspensión, ácidos, residuos automotrices (hidrocarburos y metales), materia orgánica, etc. y aunque las aguas residuales también deben ser tratadas, no todas las poblaciones cuentan con plantas depuradoras, o las tienen pero no las usan adecuadamente o no se les da mantenimiento.
3. La navegación. Los derrames petroleros (accidentales o no) y los combustibles son los principales tipos de contaminación acuática marina pues todavía no se han impulsado medidas eficientes.
4. La agricultura y la ganadería. Estas actividades producen vertidos de pesticidas, fertilizantes y restos orgánicos que en la mayoría de los casos no son controlados.

La Fig. 5 indica que la contaminación acuática no sólo se clasifica según la fuente de emisión de los contaminantes sino que también puede ser clasificada por el tipo de contaminantes que la generan (1). La contaminación física incluye la presencia de metales y elementos radiactivos, partículas resultantes de la erosión del suelo, diversos materiales arrastrados por fuertes inundaciones, residuos de erupciones volcánicas, introducción de agua salada, etc. La contaminación biológica incluye la presencia de

bacterias, virus, protozoarios, helmintos, heces fecales, etc. (35). La **contaminación química** implica la presencia de (21; 64):

Contaminantes orgánicos.

Compuestos químicos que tienen una elevada proporción de carbono reducido en su estructura química, y de forma minoritaria otros elementos como nitrógeno, fósforo, azufre, etc. por lo que pueden ser degradados fácilmente por los seres vivos a través de un proceso denominado biodegradación: en presencia de oxígeno, los microorganismos oxidan la materia orgánica. Algunos ejemplos de contaminantes orgánicos son la mayoría de los aceites, las grasas, los detergentes, los fenoles, los compuestos policlorobifenílicos, los pesticidas, etc (4; 11).

Contaminantes inorgánicos.

Sustancias no degradables por procesos biológicos que, al no desaparecer del medio, se hacen acumulativas tanto en el lugar como en los seres vivos. Algunos ejemplos de contaminantes inorgánicos son los fertilizantes, los pesticidas, los cianuros y los metales pesados (hierro, zinc, cromo, cobre, cadmio, mercurio, etc.) (4; 11).

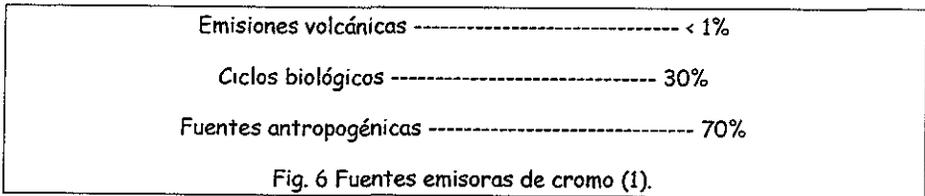
Tal vez ha sido la aparente abundancia y gratuidad del agua la que la ha convertido en el vertedero habitual de los desechos producidos por la actividad humana, lo cierto es que actualmente, la **contaminación acuática, antropogénica y química** es el tipo de contaminación ambiental que causa más problemas en todo el mundo, a corto y a largo plazo, pues es la más difícil de controlar (1).

La calidad del agua se ha deteriorado a tal grado, que en los últimos años los problemas asociados con los recursos hídricos (lagos, ríos, etc.) han constituido el tema principal de grandes conferencias mundiales donde se ha pretendido resolver y controlar tal fenómeno (40). En ellas se ha establecido que el monitoreo de la contaminación acuática puede realizarse, básicamente, a través de un análisis químico pero que éste debe ser reforzado con una aproximación biológica de los efectos que las sustancias tóxicas ejercen sobre los ecosistemas, es decir, que el uso de organismos biomonitores en la evaluación de la calidad del agua se ha considerado como una actividad de gestión ambiental que permite realizar seguimientos temporales y espaciales de diversos contaminantes, pues, como ya se mencionó, se basa en la respuesta que los seres vivos manifiestan al reaccionar con su medio (agua), permitiendo identificar si es tóxico o no (fenómeno que a veces es difícil detectar a simple vista) (29).

c) El cromo hexavalente como contaminante acuático.

La contaminación química del agua implica la presencia de sustancias inorgánicas como los metales pesados pues, aunque son sustancias naturales que han estado presentes en la Tierra desde su formación y algunos incluso desempeñan funciones vitales para los seres vivos, también pueden ser sustancias contaminantes dañinas para el medio ambiente. Existen algunos ejemplos de contaminación acuática ocasionada por metales en condiciones naturales, pero existen muchos más casos de contaminación ambiental producida por el manejo antropogénico de los metales; es decir, que los metales se

convierten en sustancias contaminantes cuando la actividad humana, principalmente, los libera de las rocas en las que se depositaron durante la actividad volcánica, o su subsiguiente erosión, y los coloca en lugares y concentraciones inadecuados donde generan un impacto ecológico negativo (Fig. 6) (62).



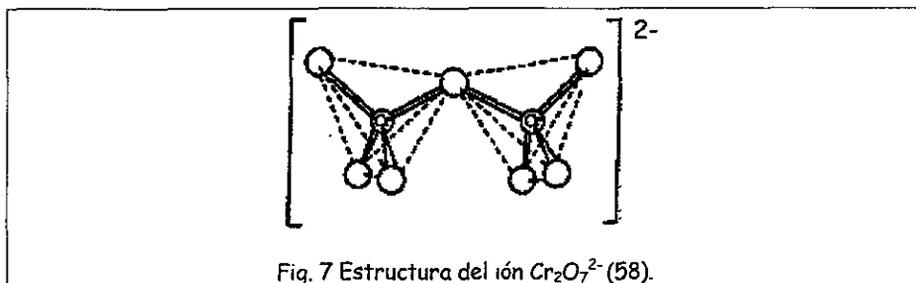
El **cromo (Cr)** es el sexto elemento más abundante en la corteza terrestre, se encuentra presente en las rocas, los suelos, los gases volcánicos y formando parte esencial de los seres vivos (en el metabolismo de los carbohidratos y las grasas, incrementando la acción de la insulina para degradar la glucosa, activando algunas enzimas, incorporando aminoácidos en las proteínas y manteniendo su estabilidad estructural junto con la de los ácidos nucleicos, etc.) (1; 23). Su nombre proviene del griego *chromos* que significa "color" y se debe a los vivos colores que presentan sus compuestos. Es un metal pesado (más denso que el agua) que fue descubierto por el químico francés Louis Nicolas Vauquelin en 1797 y cuyas características principales incluyen un peso molecular de 51.996 g/mol, diferentes valencias, color gris-acero, lustre abundante, estructura cúbica, punto de fusión de 1900 °C y punto de ebullición de 2642 °C. Se obtiene del mineral cromita ($FeO \cdot Cr_2O_3$) y desde 1981 es considerado un elemento carcinógeno por la EPA (Environmental Protection Agency) (1; 67).

El átomo de cromo presenta diferentes valencias o estados de oxidación (cargas) dependiendo del compuesto que esté formando: -2, 0, +2, +3 y +6. Los compuestos derivados de las valencias -2 y +2 son de poca importancia por su inestabilidad y la valencia 0 corresponde al cromo metálico que no se encuentra libre en la naturaleza por su alta reactividad, pero los compuestos derivados del cromo trivalente (Cr III) y hexavalente (Cr VI) son predominantes en el ambiente por ser los más estables (1; 22).

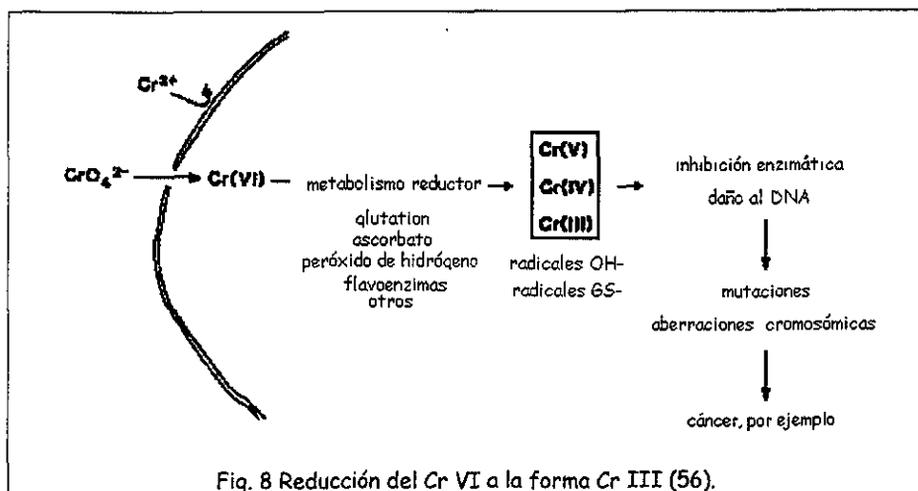
Dentro de los compuestos derivados del cromo hexavalente podemos encontrar al **dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)**, compuesto elaborado por la industria química y cuyas características principales incluyen que está constituido por cristales rojo-anaranjados muy brillosos y no higroscópicos o deliquescentes (diferencias con el dicromato de sodio), que tiene un peso molecular de 294.21 g/mol y un punto de fusión de 398 °C y que se compone por cromo en un 35.36%, potasio en un 26.58% y oxígeno en un 38.07% (63). Se utiliza en el curtido y en la tinción de las pieles, en la fabricación de productos fotográficos y fotolitografías, en el procesamiento y tinción de la madera, en la industria pirotécnica, en la fabricación de materiales resistentes al agua, en la manufactura de pigmentos y otros químicos, en el cromado de los metales como inhibidor de corrosión, etc. (1; 23), por lo que **puede encontrarse comúnmente en la naturaleza como un residuo industrial.**

Reducción del cromo.

En los dicromatos el Cr VI constituye un dianión tetraédrico (Fig. 7) que puede penetrar en la célula como un análogo del dianión tetraédrico sulfato, usando el sistema de transporte del sulfato. Es la forma más oxidada, móvil, reactiva, y tóxica del metal pues es un fuerte agente oxidante (aceptor de electrones) altamente soluble en agua, lo que facilita su paso a través de las membranas celulares; sin embargo, una vez dentro, el Cr VI es reducido rápidamente a la forma Cr III (5; 23; 58).



El Cr VI puede ser reducido en cualquier parte del interior celular donde existan donadores de electrones disponibles (ácido ascórbico, el glutatión reducido, cisteína, peróxido de hidrógeno, flavoenzimas como la glutatión reductasa u otras macromoléculas ricas en electrones) pues por cada átomo de cromo reducido se necesitan tres electrones (23), y sistemas de transporte de electrones (como el del citocromo p-450 de la membrana nuclear); sin embargo, el sitio reductor principal es el interior de las mitocondrias (Fig. 8) (23; 56).



Se cree que el Cr VI tiene dos mecanismos de acción, el primero implica que el cromo afecte de manera directa al DNA a través de las moléculas de Cr III, y el

segundo que la interacción entre el cromo y el DNA se da indirectamente a través de los radicales libres que se producen durante su reducción (23; 55; 56).

Del primer mecanismo no se tiene información suficiente sobre la interacción molecular; sin embargo, existen suficientes afirmaciones, como las de Galván, Costa, Sugiyama y Wedrychowski (16; 24; 56; 66), que dicen que el Cr III es la forma causante del daño al DNA y que lo produce interactuando directamente con la secuencia de nucleótidos.

Del segundo mecanismo se dice que cualquier compuesto que sirva como donador cíclico de electrones tiene el potencial de generar radicales libres y una de las ecuaciones que describen este comportamiento es la de Fenton (23):



que usa al ión metálico (Me) como donador de electrones para reducir al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en el radical hidroxil (HO^\bullet) y agua (H_2O). El cromo genera un centro activo redox que tiene el potencial de producir radicales de oxígeno en la ecuación de Fenton donde el radical hidroxil (o el glutationil) tiene la capacidad de dañar al DNA rompiendo el enlace fosfodiéster al extraer un protón del C-4 de la desoxirribosa haciendo que el anillo se colapse, también puede unirse a las bases generando mutaciones. Para que los radicales hagan daño deben estar cerca del DNA y esto se logra por atracción electrostática o por intercalación (55; 56).

El dicromato de potasio es un desecho industrial muy tóxico que puede incorporarse en diferentes cuerpos de agua o de aire a través de efluentes y emisiones respectivamente y, aunque tiende a alcanzar el estado trivalente que es el más estable porque puede ser absorbido por diferentes partículas para formar complejos insolubles capaces de permanecer en suspensión (acuática o aérea) o para precipitar y ser incorporado en los sedimentos, la forma química del cromo dependerá de la cantidad de materia orgánica presente en el medio. El Cr VI puede permanecer inerte en el medio ambiente hasta que exista suficiente materia orgánica para reducirlo a Cr III (1).

Los límites permisibles para el dicromato de potasio son, aproximadamente, de 17 ng/m^3 en el aire urbano, de 5 a 9 ng/m^3 en el aire rural, de 1 a 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ en ríos y lagos, de 0.1 a 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ en el mar, de 5 a 17 $\mu\text{g}/\text{L}$ en el agua potable, 250 ppm en el suelo y de 37 a 230 $\mu\text{g}/\text{día}$ en la comida (azúcar morena, grasa animal, mantequilla, vegetales, cereales, etc.); sin embargo, los desechos industriales elevan las concentraciones por encima de los límites permisibles constituyendo así un grave riesgo para el ecosistema (23).

Toxicocinética del cromo.

Absorción. El cromo puede absorberse en las formas trivalente y hexavalente por tres vías diferentes: la respiratoria, la digestiva y/o la vía dérmica, siendo la absorción más rápida (minutos) que la distribución dentro del organismo (horas o días) (1). Como el Cr VI es más soluble que el Cr III, penetra más rápido y en mayor proporción.

Distribución y depósito. La cantidad de cromo absorbido por los pulmones, el estómago, el intestino y la piel pasa al torrente sanguíneo para ser distribuido a los

demás órganos. El cromo III (ya reducido) se une a la transferrina, la albúmina u otras proteínas del plasma sanguíneo para ser transportado a todo el organismo. Los tejidos donde se lleve a cabo la acumulación del cromo depende del organismo en cuestión (pulmones en los humanos, huesos en ratas jóvenes, sangre en los cuyos, etc.) (1; 23; 56).

Excreción. El 80 % del cromo absorbido es excretado principalmente en la orina como Cr III, lo demás se pierde en las heces o por la piel (23).

Efectos adversos del cromo.

Aunque la deficiencia de cromo implica poca tolerancia a la glucosa, hiperglicemia, elevación en los niveles de colesterol y de triglicéridos, trastornos en la fertilidad, pérdida de peso, disfunción del sistema nervioso, daño al metabolismo de proteínas y carbohidratos, crecimiento disfuncional y decremento en la longevidad del organismo, un exceso en su consumo también implica diversas complicaciones (1; 23).

En particular, la toxicidad del dicromato de potasio varía dependiendo de la especie, la magnitud de la exposición y el tiempo de incubación; sin embargo, se puede decir que los efectos adversos más frecuentes son problemas dérmicos (llagas y ulceraciones), renales (insuficiencia hepato-renal y lesiones), respiratorios (lesiones nasales, perforación del tabique nasal, daño en el sistema), reproductivos (disminución de fertilidad) y genéticos (Tabla 1) (1; 22; 23).

Tabla 1 Efectos genotóxicos del Cr VI (23).

| ORGANISMO | ALTERACIÓN GENÉTICA |
|-------------------------------------|--|
| <i>Vicia faba</i> | Micronúcleos y aberraciones mitóticas |
| <i>Escherichia coli</i> | Mutaciones y baja fidelidad replicativa |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Recombinación mitótica |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | Traslocaciones |
| Camarones | Alteraciones en el DNA (28) |
| Células de mamífero <i>in vitro</i> | Mutaciones, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, alteraciones en la replicación y reparación del DNA, rompimientos de cadena y entrecruzamientos |
| Ratas <i>in vivo</i> | Micronúcleos y aberraciones cromosómicas |
| Humanos <i>in vivo</i> | Aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y micronúcleos |

d) El acocil *Procambarus clarkii* como posible organismo biomonitor.

Las acamayaz, langostas de agua dulce, langostinos o acociles (Fig. 9) son los invertebrados más grandes (10 cm) de los ecosistemas de agua dulce templada (9). Son organismos que han sido clasificados en muchos géneros diferentes distribuidos por todo el mundo, cada continente tiene una población representativa, por ejemplo, *Astacus* es característico de Europa, *Cambaroides* y *Cherax* de Asia, *Procambarus* de

Norteamérica, etc (27). Los ancestros de *Procambarus* se originaron en México entre el Cretácico y el Terciario, de donde se cree que migraron hacia el norte (47).

Procambarus clarkii pertenece al reino Animal, phylum Arthropoda, clase Crustacea, subclase Malacostraca, orden Decapoda y familia Astacoidea (7; 50).

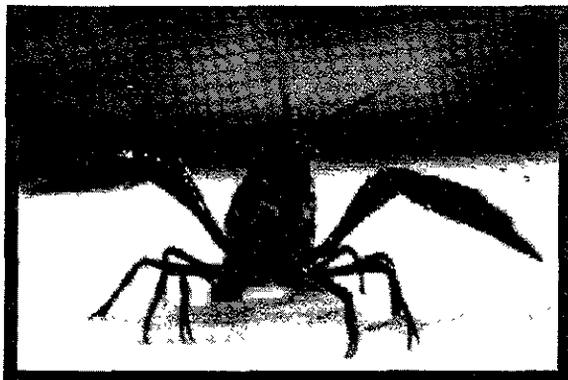


Fig. 9 *Procambarus clarkii*.

Son animales de actividad nocturna que, durante el día, tienden a esconderse debajo de las piedras o enterrándose en el lodo. Casi todos son letárgicos y de poco movimiento pues generalmente no migran, salvo algunas especies que lo hacen en cortas distancias. Viven en profundidades de 1 a 2 m y toleran amplios rangos de temperatura, de concentración de iones hidrógeno y de bióxido de carbono (27; 47).

Se alimentan de pequeñas porciones de plantas y animales vivos o muertos, aunque la alimentación depende del hábitat y éste varía según la especie (27; 61). A su vez, sirven de alimento para algunos peces, pájaros, tortugas, ranas, salamandras, etc. por lo que también sirven como carnada para algunos pescadores, e incluso, pueden formar parte de la dieta humana (27).

Debido a su fácil adaptación y resistencia natural *P. clarkii* constituye una especie capaz de vivir en diversos ambientes alcanzando grandes densidades rápidamente, por lo que se le ha llegado a considerar una plaga en diversas regiones de Norteamérica. Puede ocasionar problemas económicos de tipo ecológico y agrícolor (28; 50).

Presentan un exoesqueleto o caparazón que contiene y protege a los órganos internos y cuyo grosor varía en las distintas regiones del cuerpo. No crece de manera simultánea con el resto del organismo pues su desarrollo se efectúa generalmente por mudas sucesivas (ecdisis). Son animales de simetría bilateral que tienen el cuerpo constituido por segmentos colocados uno enseguida del otro y que reciben nombres particulares dependiendo de su posición: cefalotórax o pereión, abdomen o pleón y telson; además, cada segmento contiene dos apéndices insertados que también reciben el nombre dependiendo de su posición: antenas, anténulas, mandíbulas, maxilas, maxilípedos, pereiópodos, pleópodos y urópodos (Fig. 10) (47; 50; 61).

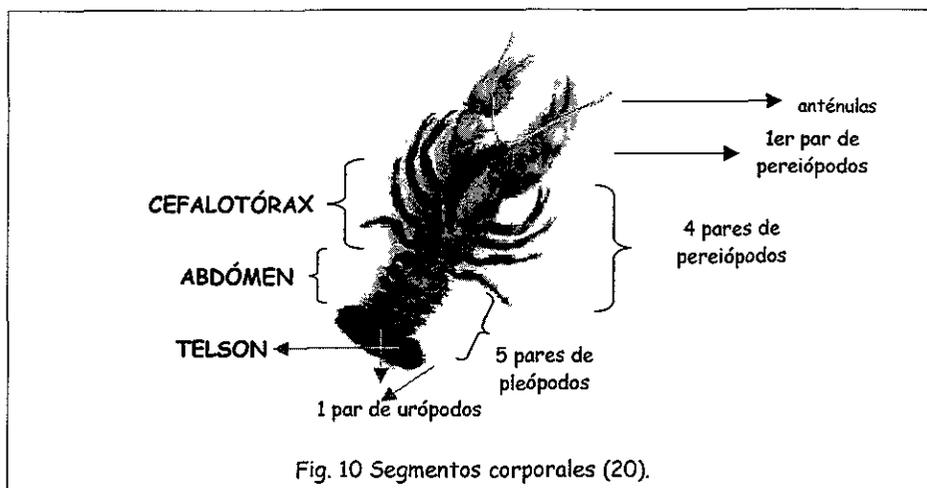


Fig. 10 Segmentos corporales (20).

En total, los acociles tienen 19 segmentos unidos por medio de membranas intersegmentales delgadas y flexibles que son las responsables de facilitar el movimiento del organismo, pues se repliegan o se extienden según la necesidad. Pueden caminar o escalar hacia adelante, hacia atrás o lateralmente gracias a los pereopodos, pero cuando se estresan, se desplazan hacia atrás rápidamente acercando bruscamente el telson a la región abdominal mediante poderosas flexiones ventrales (47; 50; 61).

Presentan dimorfismo sexual pues los machos tienen las antenas y las quelas más grandes, el abdomen más estrecho y los primeros dos pares de pleópodos modificados para la cópula (47). El cuerpo puede presentar distintos colores: negro, café, rojizo, anaranjado, verde y, ocasionalmente, azul, aunque la tonalidad varía dependiendo del hábitat.

El aparato respiratorio está constituido por dos cámaras branquiales, una en cada lado del cuerpo, a la altura de los apéndices torácicos, conteniendo cada una 18 branquias unidas cerca de la base de los maxilípedos y extendidas dorsalmente. Las branquias o tricobranquias (Fig. 11) son órganos filamentosos que están constituidos por un eje central al que se unen cientos de pequeños y delgados filamentos. Abarcan una gran superficie de absorción y reciben un aporte de sangre constante y abundante. La función respiratoria inicia con la difusión del oxígeno disuelto en el agua que, posteriormente, es transportado a través de los tubos traqueales, las tráqueas y las mitocondrias de las células traqueolares que tienen un gran poder de oxigenación (glicólisis aerobia). Con el rápido movimiento de los exopoditos maxilares o escafoñatitos, los acociles crean corrientes de agua dentro de la cavidad branquial para hacer más eficiente su respiración (50; 61).



Fig. 11 Tricobranquia (16).

Es importante resaltar que muchos acociles pueden vivir fuera del agua por largos períodos de tiempo pudiendo extraer suficiente oxígeno de sus compartimientos branquiales, siempre y cuando el aire que se encuentre en ellos tenga la humedad suficiente. *P. clarkii* puede vivir durante varios meses con niveles muy bajos de oxígeno (50; 61).

El aparato digestivo está constituido por la boca y por el canal alimenticio: intestino anterior o estomodeo que contiene la faringe, el esófago y la primera cavidad del estómago, el cardias donde se lleva a cabo la demolición del alimento; el intestino medio, de escasa longitud y que contiene la segunda cavidad del estómago, el píloro, donde se realizan la filtración y absorción de los alimentos; el hepatopáncreas, glándula digestiva que secreta los jugos gástricos y el proctodeo que abarca el 67% del total pues se extiende hasta el ano en la parte ventral del telson (Fig. 12) (47; 53).

El hepatopáncreas es un órgano compacto y trilobulado que está constituido por una gran cantidad de tubos ramificados unidos entre sí, se encuentra localizado en el cefalotórax y está en contacto con la hemolinfa. Sus funciones principales son digerir y metabolizar diversos compuestos, sintetizar y secretar enzimas, absorber (más que el intestino) y almacenar algunas sustancias (50).

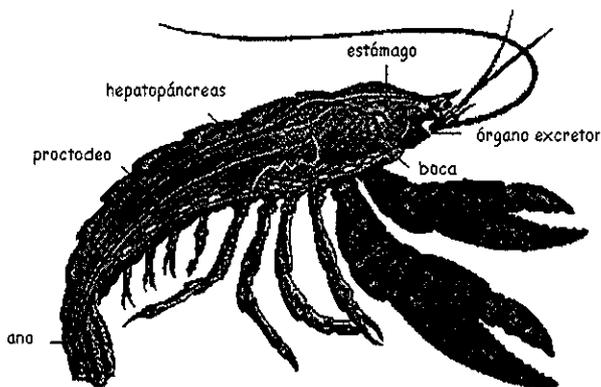


Fig. 12 Aparato digestivo (20).

El aparato circulatorio (Fig. 13) es de tipo abierto, está en contacto directo con la cavidad corporal. El vaso dorsal o corazón descansa en la porción dorsal del cefalotórax y tiene dos porciones, la anterior (aorta) y la posterior (corazón), también tiene tres pequeños orificios denominados ostiolo que comunican la cavidad del corazón con otra cavidad muy vasta que le rodea y que se llama seno pericárdico (limitado por el pericardio). Del corazón parten tres arterias principales: de la región anterior, la arteria media oftálmica (cefálica) que da lugar, a su vez, a dos arterias antenales; de las regiones laterales sale un par de arterias hepáticas (esternales) que llegan hasta la arteria ventral y de la región posterior sale la arteria abdominal superior (posterior) (47: 61).

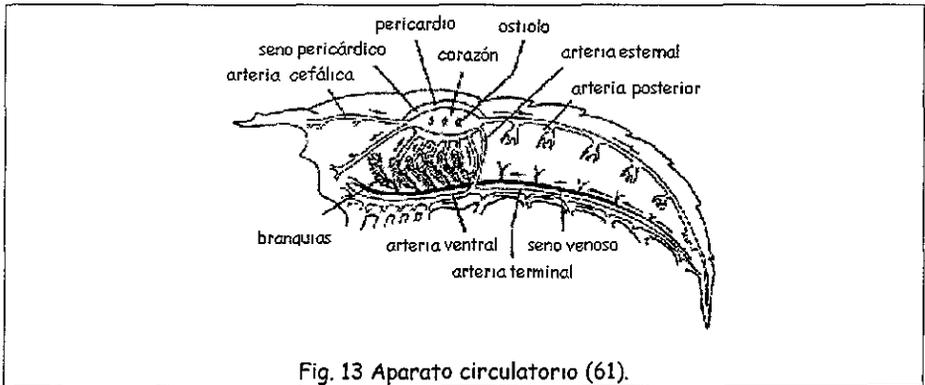


Fig. 13 Aparato circulatorio (61).

La hemolinfa, líquido corporal de los crustáceos, transporta el oxígeno a todos los órganos y tejidos del acócil, es casi transparente y está compuesta por una parte líquida denominada plasma y por células denominadas hemocitos, también presenta hemocianina disuelta (47: 61). Es un tejido en proliferación constante cuyos tipos celulares son: los coagulocitos (55-65%), los granulocitos (35-40%) y los amebocitos (2-4%) aunque el citoplasma de los tres tipos tiene retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi, mitocondrias y microtúbulos (59). Estas células son capaces de reconocer diferentes antígenos sin la necesidad de inmunoglobulinas específicas, sus mecanismos de defensa consisten en encapsular, fagocitar y/o formar nódulos (54).

La circulación de la hemolinfa inicia con la contracción del corazón, la cual la impulsa hacia diferentes regiones corporales. Viaja por varias arterias y vasos hasta llegar al hemocelo, espacio que rodea a la mayoría de los órganos, y a los órganos mismos, luego circula de regreso pasando por los senos esternal y pericárdico hasta llegar al corazón, penetrando por los ostiolo, cada una de las cuales presenta una válvula que impide su regreso. El sistema arterial está bien desarrollado (47: 53).

Algunas ventajas que presenta *P. clarkii* como animal de laboratorio incluyen su capacidad para permanecer en acuarios por largos períodos de tiempo sin requerir temperatura o periodos de luz-oscuridad regulados, tampoco sistemas de filtración específicos, y para alimentarlos basta con colocar en el agua pequeños trozos de verduras, carne o insectos, además de que es muy fácil manipularlos pues son animales

muy resistentes (27). Pero las ventajas que presenta como un posible organismo biomonitor de aguas contaminadas son:

- Que es un organismo que habita en los cuerpos de agua dulce de distintos lugares del mundo y que presenta un rango reducido de migración, por lo que podría ser utilizado en sitios específicos de ríos, lagos, etc. de diversas regiones (ventajas como organismo centinela).
- Que es un organismo bentónico que podría facilitar el monitoreo de las aguas del fondo y sus sedimentos, gran ventaja si se considera que algunos agentes contaminantes tienden a sedimentarse (6).
- Que su ciclo de vida permite obtenerlo en cualquier época del año.
- Que es fácil coleccionarlo e identificarlo.
- Que por ser una especie comestible, podría llegar a representar una fuente importante de toxicidad para otros organismos, incluyendo al ser humano.
- Que en las branquias (órganos en contacto directo con el agua), el hepatopáncreas (órgano metabólico principal) y la hemolinfa (tejido de transporte) se podrían detectar los principales biomarcadores de efecto y de exposición.

1.- BIOMARCADORES DE EFECTO.

Como ya se mencionó, los biomarcadores de efecto son los cambios resultantes de la exposición (62), y en esta categoría quedan incluidos los **biomarcadores de genotoxicidad** que describen las alteraciones que sufre el DNA después de haber interactuado con el agente tóxico. Tal interacción implica el desarrollo de cuatro fases principales: 1) el agente tóxico o alguno de sus metabolitos reaccionan con el DNA, 2) el DNA sufre alteraciones, 3) se activa el proceso de reparación (capacidad de reemplazar un segmento dañado del DNA) y 4) si la alteración no fue reparada satisfactoriamente permanecerá y se expresará hasta que la célula muera. Es muy importante mencionar que si la célula llega a dividirse la alteración será heredada a las células hijas (24; 33).

De acuerdo con la evidencia existente, los biomarcadores de genotoxicidad representan las alteraciones resultantes del contacto entre el DNA y algún agente tóxico que permanecen aún después del proceso de reparación. Su importancia radica en que pueden ejercer acciones nocivas o letales interfiriendo en la replicación, la transcripción y/o la propia reparación del DNA ocasionando el desarrollo de diversos padecimientos así como también una disminución de la capacidad reproductiva, además del riesgo de que sean heredadas a la siguiente generación de organismos si llegasen a presentarse en las células reproductivas (19; 20; 33; 62). Los biomarcadores de genotoxicidad pueden ser considerados como indicadores de enfermedad potencial (15) y entre ellos se encuentran los **micronúcleos** y los **complejos DNA-proteínas**.

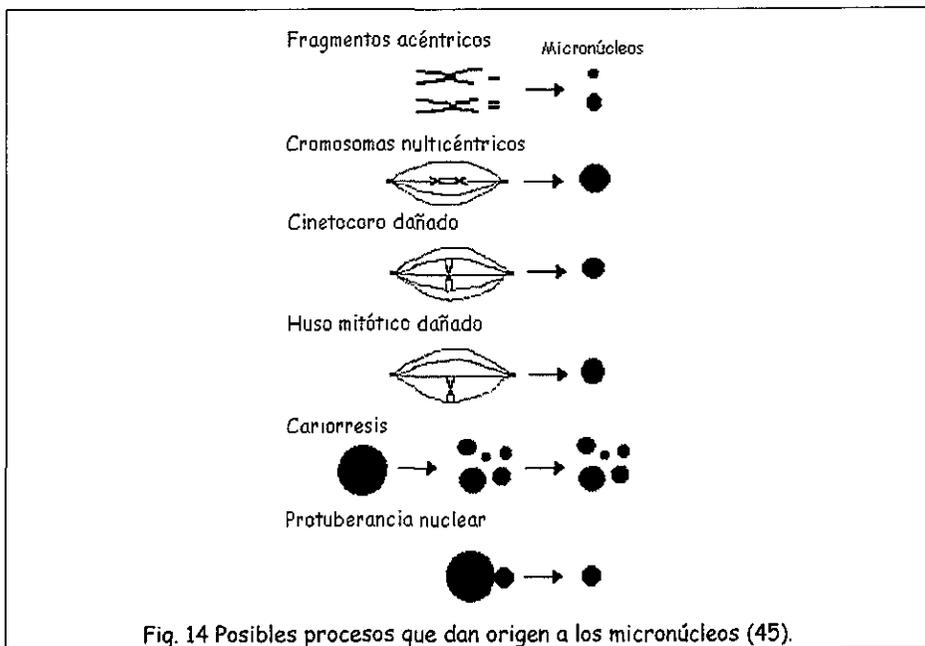
Micronúcleos (MN).

Durante la división celular, el material genético se duplica y divide de manera equitativa entre las dos células hijas que se producen. Si el proceso es interrumpido o el DNA está dañado entonces la distribución del material genético entre los núcleos de las dos células hijas puede verse afectada y partes de cromosomas o cromosomas enteros

pueden no quedar incluidos en los nuevos núcleos. Cuando esto sucede, el material genético que no se incorpora al núcleo nuevo forma un micronúcleo, claramente visible al microscopio (41).

Los micronúcleos son pequeñas partículas suspendidas en el citoplasma celular con características muy particulares: se tiñen igual que el núcleo principal, son de tamaño variado (1/50 a 1/3 del diámetro del núcleo), generalmente son redondos u ovalados, si contienen los genes reguladores son capaces de sintetizar RNA y DNA y presentan envoltura nuclear constituida por la lámina y los poros nucleares que pueden estar incompletos y distribuidos de manera heterogénea (45).

La evidencia experimental indica que son seis los procesos que pueden dar origen a los micronúcleos. La producción de fragmentos acéntricos, cromosomas multicéntricos y cinetocoro y huso mitótico dañados son procesos que dependen de la realización de una mitosis; en cambio, la cariorresis y las protuberancias nucleares ("broken eggs" o "budding nuclei") no la requieren (Fig. 14) (45).



Los fragmentos acéntricos son fragmentos cromosómicos que, por carecer del centrómero (y del cinetocoro), no pueden unirse a las fibras del huso mitótico y si no se unen a otra cromátida no se integrarán en los núcleos de las células hijas. La lesión que origina a los fragmentos acéntricos se desconoce. Los cromosomas multicéntricos pueden unirse en diferentes puntos del huso y ser atraídos por los polos opuestos, pero las cromátidas no podrán moverse y no serán integradas en las células hijas. Otra posibilidad es que los cromosomas formen un puente anafásico que, al romperse, genere fragmentos no integrados. Para que las cromátidas puedan ser atraídas por los polos del huso mitótico necesitan adherirse a sus fibras a través de un cinetocoro intacto, pero si

este está dañado, el proceso no puede realizarse y las cromátidas no podrán integrarse en los núcleos de las células hijas. Finalmente, si las fibras del huso mitótico están dañadas, los cromosomas no podrán distribuirse adecuadamente (estos micronúcleos tienen uno o más cinetocoros indicando que están formados por cromosomas completos) (45).

La cariorresis se da cuando la célula muere y el núcleo se desintegra formando fragmentos que parecen micronúcleos. Las protuberancias nucleares surgen cuando la envoltura nuclear presenta un brote de cromatina que puede o no separarse del núcleo (45).

Ambos procesos son descalificados por varios autores porque los eventos que dependen de la realización de la mitosis indican que el DNA no está siendo alterado por la señal bioquímica de inicio de apoptosis (muerte celular), mientras que la cariorresis representa el daño que sufre el DNA causado por la señal de apoptosis. Además, las protuberancias nucleares manifiestan un brote de cromatina pero no garantizan que se separe, por lo que no es posible distinguirlas de un micronúcleo en un proceso de formación o reintegración (45).

Los criterios para identificar a un micronúcleo son: un gran parecido con el núcleo celular pero de menor tamaño, DNA positivos, de forma redonda u ovalada y con el borde bien definido, no refráctiles, coplanares con el núcleo, de 1/50 a 1/3 del diámetro del núcleo y, para algunos autores, la demostración del proceso mitótico (45).

Entre las desventajas que presenta la prueba de los micronúcleos están el requerimiento de tejido en proliferación, la variación en la frecuencia basal de células del mismo tejido, el origen heterogéneo de los micronúcleos, la no detección de mutaciones puntuales o aberraciones cromosómicas y que la simplicidad de la prueba implica una alta probabilidad de error (confundir micronúcleos con diferentes partículas, no contabilizar micronúcleos escondido por debajo o por encima del núcleo, etc.). Pero las ventajas implican que es un ensayo rápido, sencillo, económico, aplicable a cualquier tejido en proliferación (fácil de obtener), que permite identificar clastógenos y otros mutágenos, que no se requiere el uso de químicos auxiliares ni equipo sofisticado, que permite una gran versatilidad en la elección del protocolo en cuanto a la edad de los organismos (*in vivo*) y al mecanismo de administración de la sustancia a evaluar, que el tiempo de ensayo es de una generación, que el material biológico puede almacenarse para un análisis posterior y que es una prueba útil en el laboratorio y en el campo (3).

La prueba de micronúcleos puede ser aplicada en la detección de agentes mutagénicos y carcinogénicos, en la predicción de la frecuencia de aberraciones cromosómicas, en el diagnóstico de riesgo embrionario, en el diagnóstico de enfermedades genéticas, en la investigación de riesgo por radiaciones, etc. pues los micronúcleos manifiestan la inducción de daño cromosómico y esto puede tener graves implicaciones, por ejemplo: cáncer, infertilidad, defectos de nacimiento o muerte fetal, entre otras (41).

La hemolinfa del acocil *Procambarus clarkii* puede ser uno de los tejidos más apropiados para evaluar genotoxicidad con la prueba de micronúcleos porque además de

ser un tejido en proliferación, es de fácil identificación, de fácil obtención, de fácil manipulación y de fácil procesamiento e identificación al microscopio.

Complejos DNA-proteínas (DPC).

Las uniones entre el DNA y algunas proteínas como las histonas, las DNA polimerasas, girasas, helicasas, nucleasas, ligasas, etc. son necesarias para que el material genético se organice y funcione adecuadamente (24). Sin embargo, el DNA es una molécula altamente reactiva que puede interactuar con otro tipo de proteínas generando alteraciones estructurales y funcionales dañinas para la célula (36). Estas uniones se denominan aductos, entrecruzamientos o complejos DNA-proteínas (Fig. 15) y representan importantes lesiones genotóxicas porque, además de ser producidas por la interacción entre el DNA y algún agente tóxico o alguno de sus metabolitos, pueden afectar los procesos de replicación, transcripción y/o reparación (14).



Fig. 15 Simulación de un complejo entre el DNA y una proteína (30)

Dentro de los agentes inductores de DPC está el cromo hexavalente y, como ya se mencionó, se cree que tiene dos mecanismos de acción: a través de su forma trivalente o a través de los radicales libres producidos durante su reducción (23; 55; 56).

Se piensa que la forma trivalente puede ser la que induce los enlaces entre las proteínas y el DNA, pues la evidencia experimental *in vivo* e *in vitro* señala que la frecuencia con que éstos se presentan está directamente relacionada con la proporción del cromo trivalente en las células (16; 24; 56; 66). También existe la posibilidad de que el cromo hexavalente genere DPC incrementando la formación de radicales oxígeno en las células durante el proceso de reducción (Fig. 8) porque este evento puede causar la oxidación de los aminoácidos y ácidos nucleicos favoreciendo su interacción (35; 48; 65).

La eficiencia del cromo trivalente para unir proteínas con el DNA depende, en parte, de los residuos de aminoácidos que tenga la proteína pues hay especial afinidad por la glicina, la cisteína, la histidina, la tirosina, la metionina y el ácido glutámico (16; 56). Dentro de las proteínas entrecruzadas por el cromo se han identificado las proteínas de la matriz y de la lámina nuclear (65).

En condiciones normales, las uniones entre el DNA y las proteínas se dan a través de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, uniones de baja energía que se rompen y se forman continuamente (24). Pero cuando se trata de complejos DNA-proteínas inducidos por el cromo, los enlaces son muy fuertes y cinéticamente inertes (16), son enlaces electrostáticos de tipo iónico (48).

Se ha reportado que el cromo puede inducir DPC en hepatocitos de embrión de pollo y en diversos tejidos de rata, y que los DPC inducidos por cromo son relativamente

persistentes en las células y no se reparan rápidamente pudiendo permanecer en el riñón de rata por más de 40 hrs. después de la exposición (48).

Aunque el significado biológico de los DPC ha sido poco estudiado, existen diversos estudios que apoyan el interés en proponer a los DPC como biomarcadores de efecto en la exposición a compuestos genotóxicos pues representan uno de los efectos primarios en tejidos blanco (48).

El **hepatopáncreas** puede ser considerado como un tejido apropiado para evaluar la formación de **complejos DNA-proteínas** porque es el órgano que realizará el proceso metabólico del cromo y esto implica que ahí se reducirá incrementando la probabilidad de interacción entre el DNA de los hepatocitos y el cromo o sus radicales. Las **branquias** también pueden ser consideradas como un órgano apropiado para evaluar **DPC** porque están en contacto directo con el agua y esto implica que los niveles de cromo pueden ser mayores que en otro órgano.

2.- BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN:

También se ha mencionado que los biomarcadores de exposición son los que indican la magnitud de la exposición a la que está sometida el organismo sin dar información contundente sobre los efectos adversos (62), en este sentido, **evaluar la presencia del cromo en las branquias** podría considerarse como tal.

2. JUSTIFICACIÓN

Este es un estudio de exposición aguda que busca desarrollar una estrategia metodológica que permita evaluar el daño genotóxico ocasionado por el dicromato de potasio (Cr VI) sobre el acocil *Procambarus clarkii*, e investigar su potencial como un organismo biomonitor de agentes genotóxicos en agua dulce contaminada. Para ello, los animales fueron expuestos a diferentes concentraciones de dicromato de potasio evaluando dos parámetros distintos de genotoxicidad, la formación de micronúcleos en las células de la hemolinfa y la inducción de complejos DNA-proteínas tanto en branquias como en hepatopáncreas. De manera complementaria evaluamos la presencia del cromo en las branquias.

a) Hipótesis.

El dicromato de potasio induce la formación de micronúcleos en las células de la hemolinfa y de complejos DNA-proteínas en las branquias y en el hepatopáncreas del acocil *P. clarkii*, mientras que el cromo se incorpora en las branquias.

b) Objetivos.

General:

Evaluar el daño genotóxico presente en acociles expuestos a diferentes concentraciones de dicromato de potasio, así como también la presencia del metal en las branquias para correlacionar los efectos observados con las concentraciones de exposición.

Particulares:

- Determinar la frecuencia de micronúcleos en células de la hemolinfa.
- Cuantificar el porcentaje de DNA involucrado en la formación de complejos DNA-proteínas en células del hepatopáncreas y de las branquias.
- Cuantificar la concentración final de cromo presente en las branquias.
- Correlacionar la toxicidad observada, la presencia del cromo en las branquias y las concentraciones de exposición.

3. MATERIAL Y METODOLOGÍA

Se utilizaron 30 acociles adultos de la especie *Procambarus clarkii*, todos machos similares en peso (≈ 27 g) y tamaño (≈ 10 cm) para asegurar semejanza en la edad y reducir el número de variables generando la mayor homogeneidad posible. Los animales fueron colectados cerca de Ciudad Jiménez en el estado de Chihuahua al norte de la República Mexicana y, antes de comenzar la experimentación, permanecieron dos semanas en acuarios de plástico con agua de la llave, con ciclos naturales de luz y oscuridad y a temperatura ambiente ($15-20^{\circ}\text{C}$) para su aclimatación a las condiciones naturales del laboratorio. Se les alimentó con pequeñas porciones de zanahoria (50).

La fase experimental consistió en formar 3 grupos de 10 acociles cada uno, un grupo testigo y dos grupos expuestos a 200 y 400 μg de dicromato de potasio por litro de agua de la llave, respectivamente. Las concentraciones fueron elegidas en función de los resultados obtenidos en ensayos previos y de los reportados para peces por Al-Sabti y López (3; 37). La exposición fue continua (sin recambios) y la alimentación igual que antes.

Después de 12 hrs de exposición (tiempo elegido arbitrariamente), 5 acociles de cada grupo fueron inmovilizados en frío (colocándolos en hielo) para luego extraer las branquias y el hepatopáncreas y determinar la inducción de complejos DNA-proteínas. Los 15 acociles restantes se sacrificaron a los 7 días de exposición (3) para determinar nuevamente la inducción de complejos en los mismos órganos, y también la frecuencia de micronúcleos en la hemolinfa y la presencia del cromo en las branquias.

a) Determinación de micronúcleos en células de hemolinfa

Basándonos en la metodología de Bolognesi (8) y aplicando las modificaciones pertinentes, primero se extrajo la hemolinfa con una micropipeta (1.5 a 2 ml), se diluyó en un volumen igual de ringer de Van Harreveld (ANEXO) y se centrifugó a $170 \times g$ durante 10 min. Después se removió el sobrenadante y el botón conteniendo los hemocitos se resuspendió en 1.5 ml de fijador (ANEXO) permaneciendo así por 20 minutos. Se centrifugó nuevamente a $170 \times g$ durante 10 min, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 1.5 ml de fijador. Una vez obtenida la suspensión celular, se goteó sobre laminillas que se dejaron secar al aire toda la noche para luego aplicar la tinción de Feulgen. El proceso consistió en hidrolizar cada laminilla con ácido clorhídrico 1 N a temperatura ambiente por 5 min, hidrolizar nuevamente con ácido clorhídrico 1 N pero a 60°C por 10 min, lavar con agua destilada durante 5 min, tratar con el reactivo de Schiff durante 1 hr, enjuagar con agua corriente y secar a temperatura ambiente. Si se desea, el citoplasma puede ser contrastado con verde rápido por 10 s, lavando con agua corriente y secando a temperatura ambiente (46).

Para determinar la frecuencia de micronúcleos se observaron las laminillas al microscopio óptico (100X) analizando un total de 3000 células por acocil.

b) Determinación de complejos DNA-proteínas en células de branquias y hepatopáncreas

Se utilizó la metodología descrita por Costa (17) con las modificaciones de Galván (24) y Ramírez (48), que consiste en obtener y aislar los complejos DNA-proteínas (DPC) a partir de un homogenado tisular enriquecido con núcleos celulares.

Una vez extraídos las branquias y los hepatopáncreas se homogenizaron con 4 ml de buffer de sacarosa (ANEXO) cada uno. La mitad de los homogenados branquiales permaneció en congelación hasta la determinación de cromo, mientras que la otra mitad y los homogenados del hepatopáncreas se filtraron con una gasa, se aforaron a 20 ml con el mismo buffer y se centrifugaron a 700 x g durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes se desecharon y los botones, conteniendo los núcleos celulares, fueron resuspendidos en 500 µl de solución A (ANEXO) y congelados a -70 °C por 24 hrs. Se descongelaron en baño maría a 37 °C y, después de tomar una muestra para determinar, más adelante, el contenido total de DNA, se pasaron 4 veces por un agujero # 21 para promover la fragmentación del DNA. Posteriormente se les agregaron 500 µl de solución B (ANEXO), se agitaron en el vórtex por 5 s a máxima velocidad, se incubaron por 10 min a 65 °C, se invirtieron 3 veces, se colocaron en hielo por 5 min y se centrifugaron a 10 000 x g (centrífuga eppendorf) durante 5 min a 4 °C, se removió el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de solución C (ANEXO) agitando levemente. La incubación, la centrifugación y la adición de solución C se repitieron 3 veces. Después de la última centrifugación, los sobrenadantes fueron removidos y los botones resuspendidos con 150 µl de solución D (ANEXO) y 15 µl de proteinasa K (ANEXO) y se dejaron incubando por 3 hrs a 50 °C. Posteriormente a cada muestra se le agregaron 25 µl de albúmina (ANEXO), se mezclaron, se dejaron incubando 3 min en hielo y se centrifugaron a 12 000 x g (centrífuga eppendorf) durante 10 min a 4 °C para, finalmente, recuperar los sobrenadantes.

Para establecer el porcentaje de DNA involucrado en los complejos con las proteínas, se determinó la cantidad de DNA presente en cada muestra por cuantificación de fluorescencia (32). Todas las muestras junto con un tubo "blanco" se incubaron en la oscuridad por 10 min con el colorante de Hoechst (ANEXO), los datos obtenidos se interpolaron en una curva patrón de DNA previamente establecida, se calcularon los equivalentes de DNA en nanogramos y se establecieron dichos porcentajes a partir del DNA total presente en las alícuotas tomadas previamente a la fragmentación con la jeringa.

La mitad del homogenado branquial que permaneció en congelación a -70 °C fue utilizada posteriormente para determinar la presencia del metal.

c) Determinación del cromo presente en las branquias

Basándonos en la metodología descrita por Almar (2; 28), el homogenado branquial (proveniente de la determinación de DPC), previamente descongelado, fue digerido con 4 ml de peróxido de hidrógeno al 50 % y 4 ml de ácido nítrico concentrado para degradar todas las partículas orgánicas. Las muestras se colocaron en una parrilla (500 °C) hasta obtener la fase sólida. Después de la evaporación, el residuo inorgánico se disolvió en 2 ml de ácido clorhídrico al 1.5 %, se aforó a 10 ml con el mismo ácido y cada

solución se filtró y se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización de la siguiente etapa experimental. Ésta consistió en medir la concentración total de cromo en un espectrofotómetro de absorción atómica (IL 257, 0.05 ppm), usando una flama de óxido nitroso-acetileno y una longitud de onda de $\lambda=357.9\text{ nm}$. Estas determinaciones se hicieron en el Laboratorio de Química Analítica del Instituto de Geofísica bajo la dirección de la Dra. María Aurora Armienta Hernández.

d) Análisis estadístico

Una vez obtenidos todos los resultados, se determinaron los promedios, las desviaciones estándar y los errores estándar. Se utilizó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) con el programa computacional SigmaStat (Windows 1.0) para evaluar el efecto del dicromato de potasio. Para estimar si las diferencias entre cada grupo eran significativas se utilizó la prueba de Dunnett con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Con el programa computacional GraphInplot (Versión 4.03 1992) se realizaron las correlaciones entre las concentraciones y los efectos.

4. RESULTADOS

Como puede observarse en la Fig. 16, el dicromato de potasio indujo la formación de micronúcleos de manera proporcional a las concentraciones de exposición, pues la proporción de células micronucleadas incrementó conforme lo hizo la concentración de dicromato de potasio en el agua. Se observa una frecuencia basal (0.06) que es superada por las frecuencias obtenidas en los acociles expuestos a 200 y 400 μg (0.33 y 0.73). Las diferencias entre cada grupo son significativas estadísticamente ($p = 0.01$).

Tabla 2. Micronúcleos en la hemolinfa.

| | Frecuencia | Promedio | Sd | Se |
|-------|------------|----------|------|------|
| C1 | 0 | 0.06 | 0.14 | 0.06 |
| C2 | 0 | | | |
| C3 | 0 | | | |
| C4 | 0 | | | |
| C5 | 0.33 | | | |
| 200-1 | 0 | 0.33 | 0.23 | 0.1 |
| 200-2 | 0.33 | | | |
| 200-3 | 0.66 | | | |
| 200-4 | 0.33 | | | |
| 200-5 | 0.33 | | | |
| 400-1 | 0.33 | 0.73 | 0.43 | 0.19 |
| 400-2 | 1 | | | |
| 400-3 | 0.33 | | | |
| 400-4 | 1.33 | | | |
| 400-5 | 0.66 | | | |

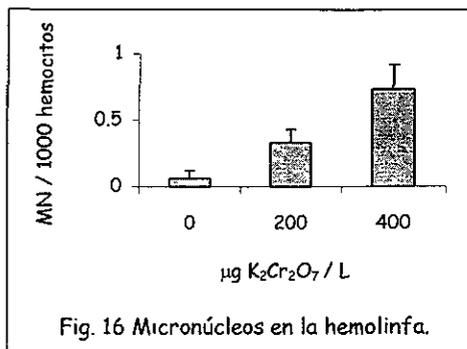


Fig. 16 Micronúcleos en la hemolinfa.

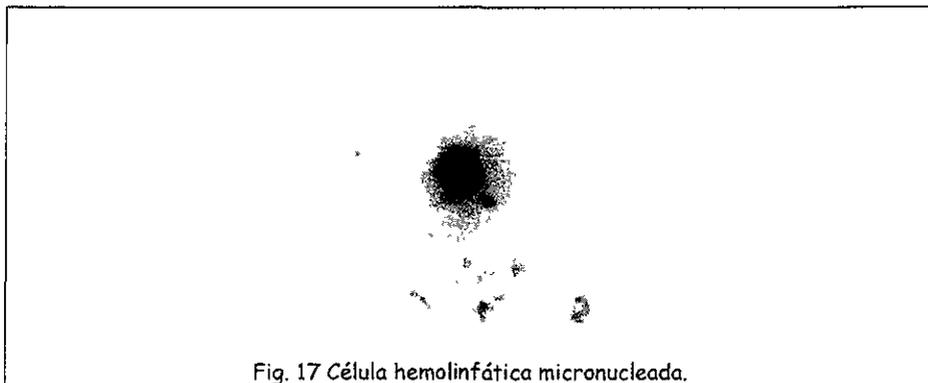


Fig. 17 Célula hemolinfática micronucleada.

En la Fig. 18 puede apreciarse que la concentración de cromo acumulado en las branquias también aumentó de manera proporcional a la concentración de exposición. Las diferencias entre cada grupo son significativas estadísticamente ($p = 0.001$).

Tabla 3. Cromo en las branquias.

| | $\mu\text{M} / \text{g}$ | Promedio | Sd | Se |
|-------|--------------------------|----------|------|------|
| C1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| C2 | 0 | | | |
| C3 | 0 | | | |
| C4 | 0 | | | |
| C5 | 0 | | | |
| 200-1 | 0.14 | 0.37 | 0.17 | 0.07 |
| 200-2 | 0.26 | | | |
| 200-3 | 0.49 | | | |
| 200-4 | 0.53 | | | |
| 200-5 | 0.45 | | | |
| 400-1 | 0.66 | 1.54 | 1.12 | 0.5 |
| 400-2 | 3.4 | | | |
| 400-3 | 1.28 | | | |
| 400-4 | 0.69 | | | |
| 400-5 | 1.68 | | | |

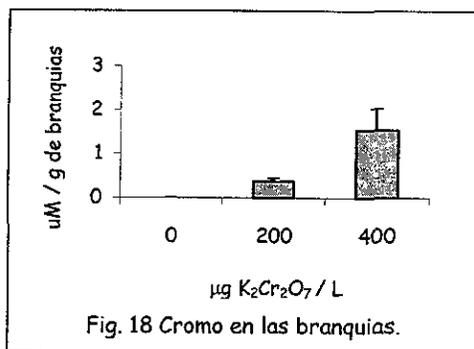


Fig. 18 Cromo en las branquias.

Para investigar la relación entre los biomarcadores de exposición y de efecto, se realizó una correlación entre la frecuencia de micronúcleos y la cantidad de cromo presente en las branquias. En la Fig. 19 se muestra la correlación entre ambos parámetros. Puede observarse que existe una relación de tipo lineal ($p = 0.01$ y $r = 0.64$) pues, al aumentar la concentración de exposición, aumentan la acumulación de cromo en las branquias y, en consecuencia, la frecuencia de micronúcleos en las células de la hemolinfa.

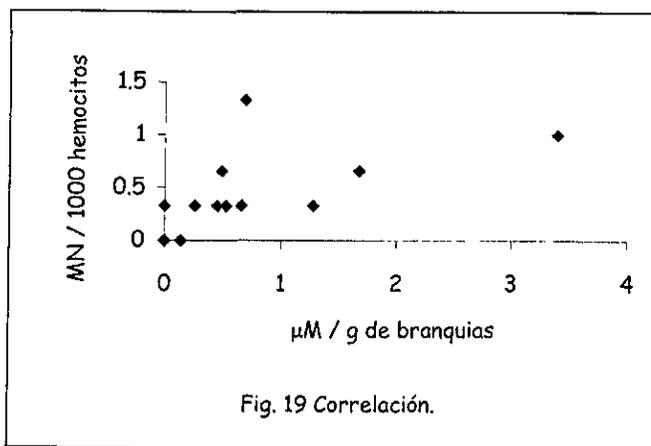


Fig. 19 Correlación.

$r = 0.64$
 $p = 0.01$

Las Fig. 20 y 21 muestran que la inducción de complejos DNA-proteínas no fue significativa en ninguno de los tratamientos y en ninguno de los tejidos estudiados.

Tabla 4. Hepatopáncreas (12 horas).

| | % DNA | Promedio | Sd | Se |
|-------|-------|----------|------|------|
| C1 | 0.07 | 0.34 | 0.2 | 0.09 |
| C2 | 0.24 | | | |
| C3 | 0.31 | | | |
| C4 | 0.47 | | | |
| C5 | 0.61 | | | |
| 200-1 | 0.14 | 0.61 | 0.79 | 0.35 |
| 200-2 | 0.55 | | | |
| 200-3 | 1.98 | | | |
| 200-4 | 0.22 | | | |
| 200-5 | 0.09 | | | |
| 400-1 | 0.07 | 0.21 | 0.14 | 0.06 |
| 400-2 | 0.03 | | | |
| 400-3 | 0.28 | | | |
| 400-4 | 0.23 | | | |
| 400-5 | 0.39 | | | |

p = 0.49

Tabla 5. Hepatopáncreas (7 días).

| | % DNA | Promedio | Sd | Se |
|-------|-------|----------|------|------|
| C1 | 1.41 | 1.22 | 0.66 | 0.29 |
| C2 | 0.66 | | | |
| C3 | 0.45 | | | |
| C4 | 2.06 | | | |
| C5 | 1.54 | | | |
| 200-1 | 0.91 | 1.27 | 0.74 | 0.33 |
| 200-2 | 2.52 | | | |
| 200-3 | 1.32 | | | |
| 200-4 | 0.59 | | | |
| 200-5 | 1 | | | |
| 400-1 | 1.39 | 0.89 | 0.38 | 0.17 |
| 400-2 | 1.22 | | | |
| 400-3 | 0.62 | | | |
| 400-4 | 0.58 | | | |
| 400-5 | 0.66 | | | |

p = 0.59

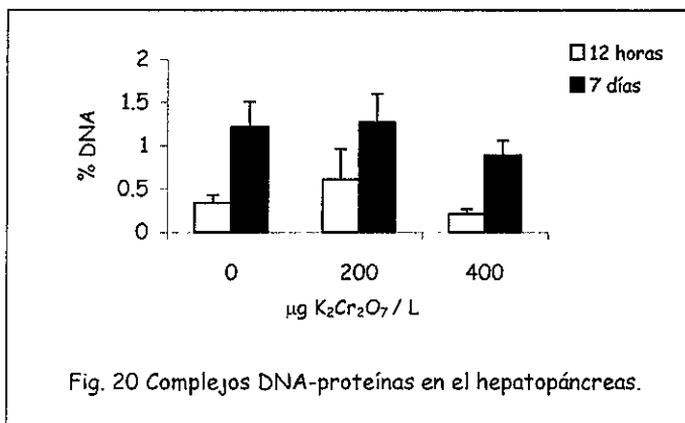


Tabla 6. Branquias (12 horas).

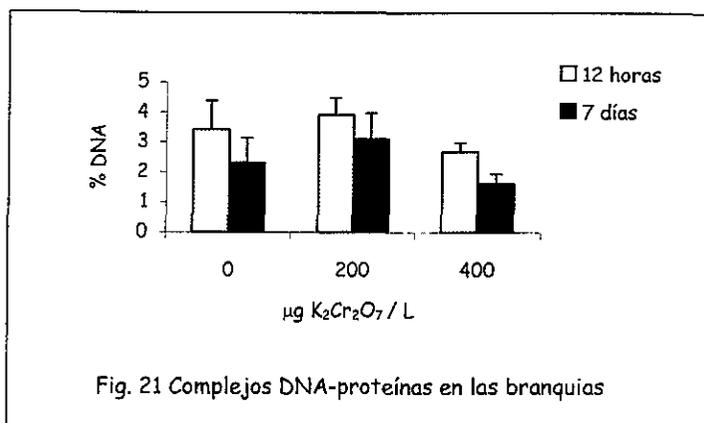
| | % DNA | Promedio | Sd | Se |
|-------|-------|----------|------|------|
| C1 | 6.23 | 3.41 | 2.18 | 0.97 |
| C2 | 4.87 | | | |
| C3 | 3.38 | | | |
| C4 | 1.41 | | | |
| C5 | 1.16 | | | |
| 200-1 | 3.53 | 3.91 | 1.29 | 0.57 |
| 200-2 | 2.84 | | | |
| 200-3 | 2.61 | | | |
| 200-4 | 5.51 | | | |
| 200-5 | 4.98 | | | |
| 400-1 | 3.55 | 2.68 | 0.7 | 0.31 |
| 400-2 | 3.22 | | | |
| 400-3 | 2.23 | | | |
| 400-4 | 1.83 | | | |
| 400-5 | 2.566 | | | |

p = 0.4

Tabla 7. Branquias (7 días).

| | % DNA | Promedio | Sd | Se |
|-------|-------|----------|------|------|
| C1 | 0.85 | 2.31 | 1.86 | 0.83 |
| C2 | 0.42 | | | |
| C3 | 5.13 | | | |
| C4 | 2.28 | | | |
| C5 | 2.31 | | | |
| 200-1 | 2.31 | 3.11 | 1.94 | 0.87 |
| 200-2 | 5.95 | | | |
| 200-3 | 2.61 | | | |
| 200-4 | 3.92 | | | |
| 200-5 | 0.75 | | | |
| 400-1 | 1.62 | 1.62 | 0.75 | 0.33 |
| 400-2 | 0.47 | | | |
| 400-3 | 2.17 | | | |
| 400-4 | 2.41 | | | |
| 400-5 | 1.41 | | | |

p = 0.37



5. DISCUSIÓN

Se ha establecido que el uso de los organismos biomonitores es una aproximación científica muy válida para evaluar el efecto que pueden generar diversas sustancias tóxicas sobre los seres vivos, pues se pueden obtener datos cuantitativos que permitan desarrollar modelos matemáticos para investigar la relación entre la exposición y el efecto biológico, otorgando la posibilidad de predecir su impacto (28).

En este trabajo se analizó el potencial del acocil *Procambarus clarkii* como un posible organismo biomonitor, y se encontraron datos cuantitativos que afirman que, de manera similar a lo observado en células de peces (37) y de mamíferos (48), el cromo también es un agente genotóxico para este invertebrado. Más aún, la inducción de micronúcleos en *P. clarkii* y *C. auratus* (peces) se observó en concentraciones similares. Esto indicaría que ambas especies (y tal vez ambos grupos taxonómicos) podrían tener una sensibilidad parecida. Esta información resulta relevante en la determinación del riesgo, cuando se calculan los niveles en donde no se detectan efectos adversos (NOAEL y NAEL).

La presencia de micronúcleos en las células hemolinfáticas dependió directamente de la concentración de cromo presente en el agua, ya que la frecuencia aumentó conforme lo hizo la concentración de exposición (Fig. 16). Asimismo, el daño cromosómico correlacionó de una manera lineal con la cantidad de cromo determinada en las branquias (Fig. 19). Esto era de esperarse puesto que la hemolinfa circula constantemente por las branquias y de esta manera los hemocitos podrían quedar expuestos a los agentes xenobióticos.

También se encontró una relación directa entre las cantidades de cromo presentes en el agua y en las branquias, pues al aumentar la presencia del dicromato de potasio en los acuarios también aumentó la cantidad del metal en las branquias de los acociles (Fig. 17). Estos resultados son similares a los publicados por Hernández (28) en donde encontraron una acumulación preferencial de cromo VI en las branquias de *P. clarkii*.

A diferencia de lo observado en hígado de ratón (24), no encontramos un incremento en el porcentaje de complejos DNA-proteínas en el órgano equivalente de *P. clarkii* el hepatopáncreas (como órgano metabólico), tampoco en las branquias (como órgano filtrador) (Figs. 19 y 20). La explicación puede deberse a que la metodología utilizada fue descrita para sistemas *in vitro* con células de mamífero (17; 24; 44) y, aunque realizamos modificaciones pertinentes, éstas no pudieron superar la diferencia que implica el utilizar células de un invertebrado *in vivo*. Eliminando la responsabilidad del error metodológico, la explicación podría estar en la propia cinética de inducción de los DPC, que sería diferente en este invertebrado. Se postula que la aparición de los entrecruzamientos requiere un incremento en los radicales libres producidos durante la reducción del cromo hexavalente y que la reducción se realice en proximidad con el DNA, pero si el aislamiento de los DPC ocurre antes o después de que se han elevado los niveles de moléculas reactivas o el proceso de reducción se da a distancia del DNA, entonces la probabilidad de detectarlos sería muy baja ya que, citando a Ramírez (48)

los DPC se pueden reparar disminuyendo progresivamente hasta regresar a los valores control, incluso en las primeras 24 horas de tratamiento. Para resolver este problema habría que conocer con más detalle el metabolismo del cromó en esta especie, y entonces, investigar el tiempo de formación y remoción de DPC en los tejidos mencionados.

Si bien, no pudimos demostrar un efecto directo al ADN, como lo es la presencia de DPC, si encontramos evidencias de que el cromó induce daño cromosómico. El origen de los micronúcleos, como se mencionó previamente, se debe a alteraciones en la distribución de los cromosomas o a la existencia de fragmentos cromosómicos que no se incorporan al núcleo principal. Estos eventos ocurren durante la división celular y no pueden ser reparados (a diferencia de los DPC) lo cual nos ofrece una ventana de mayor oportunidad para visualizarlos.

La capacidad del acocil *Procambarus clarkii* para indicar efectos genotóxicos no había sido estudiada hasta ahora, por lo que resulta de gran importancia el conocer su respuesta ante una sustancia que se encuentra presente en gran cantidad de descargas industriales que, finalmente, se vierten sin previo tratamiento en los cuerpos de agua.

Los datos obtenidos en este trabajo permiten afirmar que *P. clarkii* puede ser utilizado como un organismo biomonitor de compuestos genotóxicos derivados del cromó hexavalente. Esta especie (así como probablemente otras especies de acociles) además de presentar diversas ventajas como animales de laboratorio y de campo (previamente mencionadas) poseen una cantidad suficiente de células hemolinfáticas donde resulta factible implementar el ensayo de micronúcleos. Esta prueba ha sido ampliamente validada y es uno de los ensayos requeridos por las agencias internacionales en los estudios de toxicidad *in vivo* (26). Por estas mismas razones, se cuenta con una gran base de datos en numerosas especies y sistemas de prueba, sin embargo este trabajo parece ser el primero en utilizar este ensayo en acociles.

Debido al escaso requerimiento de equipo, la prueba de MN resulta muy adecuada para el trabajo de campo. En el caso de la determinación de la concentración de cromó en branquias, si bien se requiere de un espectrofotómetro de absorción atómica, la metodología empleada no es complicada y puede realizarse bajo la supervisión adecuada.

Lo anterior indica que el acocil *Procambarus clarkii* es un sistema biológico apropiado para el monitoreo ambiental porque permite realizar evaluaciones de manera sensible, económica, eficiente, rápida y confiable. Sin embargo, es necesario mencionar que uno de los mayores retos de la ecotoxicología es desarrollar la habilidad de extrapolar los datos obtenidos en el laboratorio a la estructura y funcionamiento del ecosistema real (dilema laboratorio-campo) (33) por lo que también resulta necesario realizar pruebas *in situ* para corroborar nuestra propuesta.

6. CONCLUSIONES

- ✓ La presencia del cromo hexavalente en las branquias está directamente relacionada con las concentraciones de exposición.
- ✓ El cromo resultó ser un agente inductor de micronúcleos en *P. clarkii*, de manera similar que para otras especies (peces y mamíferos).
- ✓ Al aumentar la presencia del cromo en las branquias del acocil también incrementó la frecuencia de micronúcleos en las células de la hemolinfa.
- ✓ No encontramos inducción de complejos DNA-proteínas en ninguno de los tejidos y en ninguno de los dos tratamientos, por lo que podemos suponer que la metodología utilizada no fue la adecuada, que los DPC no se indujeron o que fueron reparados
- ✓ *P. clarkii* demostró ser un organismo que puede emplearse como organismo centinela de compuestos genotóxicos presentes en cuerpos de agua dulce.
- ✓ Aunque trabajar con animales *in vivo* puede generar respuestas más difíciles de interpretar, proporcionan una respuesta integral del sistema biológico.

7. PERSPECTIVAS

- ✓ Identificar el contenido de los micronúcleos utilizando, por ejemplo, la hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH).
- ✓ Automatizar el conteo de micronúcleos (45).
- ✓ Establecer la frecuencia de micronúcleos en cada uno de los tres tipos celulares de la hemolinfa con la técnica propuesta por Smith-Söderhäll (54) para diferenciarlos.
- ✓ Establecer la metodología adecuada para la identificación de los complejos DNA-proteínas, incluso, determinar el tipo de proteínas participantes usando, por ejemplo, distintos anticuerpos que puedan seguir a las proteínas durante el entrecruzamiento (24; 48).
- ✓ Comparar los resultados de esta investigación con otros biomarcadores como: diversas alteraciones en el ciclo celular, la inhibición de síntesis de DNA, la síntesis no programada, el daño germinal, etc.
- ✓ Realizar pruebas *in situ* para corroborar la capacidad del acocil *Procambarus clarkii* como un organismo biomonitor de compuestos genotóxicos presentes en aguas contaminadas.
- ✓ Aunque analizamos la magnitud y la vía de exposición, algunos de los efectos adversos y la relación entre la exposición y los efectos observados, faltaría analizar los mecanismos de acción, la reversibilidad de la respuesta tóxica, los factores que puedan modificar la toxicidad y extrapolar los resultados a niveles superiores de organización biológica.

8. ANEXO

Tabla 8. Lista de reactivos.

| | |
|---|--|
| Ringer de Van Harrevelde: | |
| NaCl | 51.3 mM |
| KCl | 1.3 mM |
| CaCl ₂ | 3.4 mM |
| MgCl ₂ | 0.3 mM |
| Aforar a 100 ml con agua destilada y ajustar el pH = 7.5. | |
| Fijador: | |
| Metanol - ácido acético (3:1). | |
| Buffer de sacarosa con inhibidores: | |
| Sacarosa | 0.32 M |
| Tritón X-100 | 1 % |
| MgCl ₂ | 5 mM |
| Tris-HCl | 10 mM |
| Azida de sodio | 30 ml (disolver 0.000975 g en 30 ml de agua destilada) |
| PMSF | 10 ml (disolver 100 mg en 10 ml de isopropanol) |
| Aforar a 1000 ml con agua destilada y ajustar pH = 7.4. | |
| Solución A: | |
| SDS | 2 % |
| PMSF | 1 mM |
| Tris-HCl | 20 mM |
| Aforar a 100 ml con agua destilada y ajustar pH = 7.5. | |
| Solución B: | |
| KCl | 200 mM |
| Tris-HCl | 20 mM |
| Aforar a 100 ml con agua destilada y ajustar pH = 7.5. | |
| Solución C: | |
| KCl | 100 mM |
| Tris-HCl | 20 mM |
| Aforar a 100 ml con agua destilada y ajustar pH = 7.5. | |
| Solución D: | |
| KCl | 100 mM |
| Tris-HCl | 100 mM |
| EDTA | 10 mM |
| Aforar a 100 ml con agua destilada y ajustar pH = 7.5. | |
| Proteinasas K: | |
| Disolver 2 mg en 1 ml de agua destilada. | |
| Albúmina (BSA): | |
| Disolver 4 mg en 1 ml de agua destilada. | |
| Hoechst: | |
| Disolver 1 mg en 1 ml de agua destilada y aforar a 50 ml. | |

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

9. REFERENCIAS

1. Albert, L. A. (1997) *Introducción a la Toxicología Ambiental*. Organización Mundial de la Salud. Metepec, Edo. de México, México. Pp 1-5 y 227-246.
2. Almar, M. et al (1987) *Glutathione Content and GSHS-transferase Activity in Midgut Gland of Procambarus clarkii. Sex Differences, the Effect of Fasting, and Their Implications in Cadmium Toxicity*. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 87C No. 2. Pp. 433-435.
3. Al-Sabti, et al (1993) *Chromium-induced micronuclei in fish*. Applied Toxicology.
4. Ayuntamiento de Barcelona, España, (http://www.mediambient.bcn.es/cas/web/cont_bcn_aigua_presen.htm).
5. Bartlett, R. J. (1991) *Chromium cycling in soils and water: links, gaps and methods*. Environmental Health Perspectives. Vol 92. pp 17-24.
6. Bitner, M. Et al (1997) *Metal accumulation in crayfish Procambarus clarkii exposed to a petroleum-contaminated Bayou in Louisiana*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 37, 267-272.
7. Bliss, D. E. (1990) *Shrimps, Lobsters and Crabs*. Columbia University Press. N. Y., EUA. Pp 65-78.
8. Bolognesi, C. et al (1999) *Genotoxicity Biomarkers in the Assessment of Heavy Metal Effects in Mussels: Experimental Studies*. Environmental and Molecular Mutagenesis (33:287-292). Pp 287-292.
9. Brusca, C. et al (1990) *Invertebrates*. Sinaver Associates Inc. Massachusetts, EUA. Pp 595-666.
10. Butterworth, F. M. et al (1995) *Biomonitors and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum Press. N. Y., EUA. Pp. 3-6, 116-117 y 193-195.
11. Centro de Estudios e Investigaciones Tecnológicas de la Universidad de Navarra, España, (<http://www1.ceit.es/Asignaturas/ecologia/CursOnLin/11ContAgua>).
12. Comisión Nacional de la Investigación Científica y Tecnológica, Chile, (<http://www.conicyt.cl>).
13. Consejo de Cuenca del Valle de México, México, (<http://www.ccum.org.mx/gestion.htm>).
14. Costa, M., Zhuang, Z. (1994) *Development of an ¹²⁵I-Postlabeling assay as simple, rapid and sensitive index of protein-cross-links*. Environmental Health Perspectives. 102 (suppl.3) 301-304.
15. Costa, M. (1991) *DNA-protein complexes induced by chromate and other carcinogens*. Environmental Health Perspectives. Vol. 92 pp 45-52.
16. Costa, M. et al (1992) *Analysis of the binding sites of chromium to DNA and protein in vitro and in intact cells*. Carcinogenesis. Vol. 13 No. 12. pp 2341-2346.
17. Costa, M., Zhitkovich, A. (1992) *A simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and in vivo*. Carcinogenesis. Vol. 13 No. 8. Pp 1485-1489.
18. Dickson, J. S., Dillaman, M. Et al (1991) *Distribution and characterization of ion transporting and respiratory filaments in the gills of Procambarus clarkii*. Biol. Bull. 180, 154-166.
19. Eckert, R. (1990) *Fisiología Animal*. McGraw-Hill. Madrid, España. Pp 30-33.
20. Enciclopedia Interactiva Encarta 2000.

21. Escuela Superior de Ingenieros, España,
<http://www1.ceit.es/asignaturas/Cursos/ii/cuarto/ciemedamTEMA1contaminagua.htm>
22. Figueroa, N. A. (1988) *Curso básico de toxicología ambiental*. Limusa. D.F., México.
23. Fishbein, L *et al* (1987) *Genotoxic and Carcinogenic Metals: Environmental and Occupational Occurrence and Exposure*. Princeton Scientific Publishing Co. N. J., EUA. Pp 87-125 y 265-270.
24. Galván, L. (1998) *Unión AND-proteínas como indicador de exposición aguda a arsénico*. Tesis de Licenciatura, UNAM.
25. *Gestión ambientalmente racional de las sustancias químicas desde la perspectiva de la industria* (1997) Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAP. D. F., México. Pp 13.
26. Hayes, W. (1994) *Principles and Methods of toxicology*. Raven Press. N. Y., EUA.
27. Headstrom, R. (1979) *All About Lobsters, Crabs, Shrimps and Their Relatives*. Dover Publications Inc. N. Y., EUA. Pp 13-69.
28. Hernández, F. *et al* (1986) *Determination of chromium in treated crayfish, Procambarus clarkii, by electrothermal AAS; study of chromium accumulation in different tissues*. *Environ. Contam. Toxicol.* 36:851-857.
29. International Development Research Centre, Canadá,
(<http://www.idrc.ca/aquatox/sp/experimental/activity>).
30. Kornberg, A.; Baker, T. (1992) *DNA Replication*. Freeman & Co. N. Y. EUA. Pp 352.
31. Kortemcamp *et al* (1994) *Chromium cross-links glutathione and cysteine to DNA*. *Carcinogenesis* 10 (11) 2165-8.
32. Labarca, C, *et al* (1980) *A simple, rapid and sensitive assay procedure*. *Analytical Biochemistry* 102: 344-352.
33. Landis, W. *et al* (1995) *Introduction to Environmental Toxicology*. Lewis Publishers. Fl., E. U. A. Pp 197-204.
34. Lewin, B. (1997) *Genes VI*. Oxford University Press. N. Y., EUA. Pp 89-95.
35. Libro electrónico "Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente", España,
(<http://www1.ceit.es/asignaturas/ecologia/Hipertexto/00General/Principal.html>)
36. Lilley, D. M. J. (1995) *DNA-protein: Structural Interactions*. Irl Press. Gran Bretaña. pp 1-21.
37. López, Q.; Solís, B. (2001) *Efectos genotóxicos del cromo en la carpa C. auratus*. Tesis de Licenciatura en proceso, UNAM.
38. Margulis, L., Schwartz, K. V. *Cinco Reinos*. Facultad de Ciencias, UNAM. Pp 224-225.
39. Marquardt, H. *Et al* (1999) *Toxicology*. Academic Press. Sand Diego, Ca., EUA. Pp 545-553.
40. Medioambiente y Desarrollo Sostenible, Red Euro Sur, Sistema Integrado de información y Comunicación al Servicio del Tercer mundo,
(<http://www.eurosur.org/medioambiente/bif72.htm>).
41. Mersch, J. *Et al* (1996) *Induction of micronuclei in haemocytes and gills of zabra muessels Dreissena polymorpha, exposed to clastogens*. *Mutation Research.* 371 47-55.
42. Moriarty, F. (1999) *Ecotoxicology*. Academic press. Gran Bretaña. Pp 217-254.

43. Naich, M., Alikhan, M. A. (1987) *Haemolymph characteristics of a copper-tolerant decapod Orconectes virilis*. Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie. 95, 133-139.
44. Nies, E. et al (1991) *The activity of glutathione S-transferase in hepatopáncreas of P. clarkii: seasonal variations and the influence of environmental pollutants*. Comp. Biochem. Physiol. Vol 1 pp 65-66.
45. Obe, G. (1994) *Advances in mutagenesis resaearch*. Springer-Verlag. Berlin, Alemania. Pp 1-108.
46. Paul, J. (1980) *Cell and Tissue Culture*. Aberdeen University Press. London, Great Britain. Pp 333-336.
47. Pennak, R. W. (1953) *Fresh-Water Invertebrates of the United States*. The Ronald Press Co. N. Y., USA. Pp 321-325 y 447-469.
48. Ramírez, P. (2000) *Estudio de los entrecruzamientos ADN-ptoteínas inducidos por arsénico*. Tesis de doctorado, UNAM.
49. Reyes, F. et al (1992) *Toxicología Prospectiva y Seguridad Química*. Organización Mundial de la Salud. Metepec, Edo. de México, México. Pp 001-097.
50. Ricalde, I. (1999) *Efectos de la irradiación y el fotoperiodo sobre la concentración de glutatión en la hemolinfa de dos especies de acocil: Procambarus clarkii y Procambarus Digueti*. Tesis de Licenciatura, UNAM.
51. Sherman, I. (1987). *Biología: perspectiva humana*. McGraw-Hill. D. F., México. Pp 105-116.
52. Shupack, S. I. (1991) *The chemistry of chromium and some resulting analytical problems*. Environmental Health Perspectives. Vol 92 pp 7-11.
53. Smith, V., J. et al (1983) β 1,3-glucan activation of crustacean haemocites in vitro and in vivo. Biol Buul. 164:299-314.
54. Smith, V., J. et al (1983) *Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the fresh-water crayfish Astacus astacus by components of the prophenoloxidase activating system in vitro*. Cell and Tissue Research 233:295-303.
55. Sugden, K. D. (1992) *Oxygen radical-mediated DNA damage by redox. Active Cr (III) complexes*. Biochemistry. 31: 11626-11631.
56. Sugiyama, M. (1991) *Effects of vitamins on chromium (VI)-induced damage*. Environmental Health Perspectives. Vol. 92. pp 63-70.
57. Sullivan, J. B. et al (1992) *Hazardous Materials Toxicology*. Williams & Wilkins. Pp 18-20, 891-895.
58. Tsapakos, M. J., Wetterhahn, K. E. (1983) *The interaction of chromium with nucleic acids*. Chem. Biol. Interactions. 46: 265-277.
59. Uhrík, B. et al (1989) *The roles of haemocytes during degeneration and regeneration of crayfish muscle fibers*. Cell Tissue Research. 255: 443-449.
60. Universidad de Santiago de Chila, Chile, (<http://lauca.usach.cl/ima/cureula.htm>).
61. Vázquez, G. L. (1987) *Zoología del Phylum Arthropoda*. Interamericana. D. F., México. Pp 223-229.
62. Walker, C. H. (1997) *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis. Salisbury, Great Britain. Pp 3, 27-46, 107-138, 175-185 y 195-209.
63. Wang, H. (1999) *Clastogenicity of Chromium contaminated soil samples evaluated by Vicia root-micronucleus assay*. Medline (<http://research.bmn.com/medline>).

64. Web Oficial del Sector Salud en Costa Rica, Costa Rica, (<http://www.netsalud.sa.cr/aya/contam00.html>).
65. Wedrychowski, A. *et al* (1985) *Chromium-induced cross-linking of nuclear proteins and DNA*. Biological Chemistry. Vol 260 No. 11 pp 7150-7155.
66. Wedrychowski, A. *et al* (1986) *The in vivo cross-linking of proteins and DNA by heavy metals*. Biological Chemistry. Vol 261 No. 7 pp 3370-3376.
67. Windholz, M. *et al* (1983) *The Merck Index. &CO. N. J., EUA*. Pp 2211 y 7502.
68. Wingrove, A. *et al* (1984) *Química Orgánica*. Harper & Row Publishers, Latinoamericana. Pp 20-30.