



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**“Análisis de las alteraciones en células sanguíneas del pez
bagre (*Ariopsis felis*) de Tecolutla, Veracruz para
establecer un diagnóstico de salud”**

T E S I S

Que para obtener el grado de
MAESTRO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

Hidrobiólogo Misael Hernández Díaz

Comité Tutorial:

Director

Dra. Xochitl Guzmán García

Asesoras:

Dra. Edith Cortés Barberena

Dra. Marcela Galar Martínez

Ciudad de México, 13 de diciembre del 2018.

La Maestría en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa, pertenece al Padrón Nacional de Posgrados de
Calidad del CONACyT y cuenta con el apoyo del mismo convenio PFP-
20-93.

Con el número de beca: 789349

Esta Tesis forma parte del proyecto: “**Indicadores de Integridad Ecológica y Salud Ambiental**”, aprobado por el departamento de Hidrobiología, Área de Manejo Integral de Recursos Acuáticos (MIRA) en el laboratorio de Ecotoxicología de la UAM-I.

Agradezco de manera especial el apoyo del personal del laboratorio de Ecotoxicología, así como la asesoría en el montaje y análisis de técnicas tisulares a la **Biol. e H. T. Irma Hernández Calderas**.

Agradecemos el apoyo del **Dr. Juan Carlos Segoviano Ramírez** encargado de la Unidad de Bioimagen del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), por la asesoría técnica y académica en la edición y análisis de fotomicrografías.

Asimismo, agradecemos el apoyo y asesoría del **cDr. Felipe de Jesús Muñoz González** por su contribución y elaboración del programa de análisis histopatológico titulado: IINDEX-PH: índice de impacto de contaminación y salud, utilizado en este proyecto.

Comité Tutorial

Directora.

Dra. Xochitl Guzmán García.

Laboratorio de Ecotoxicología. Departamento de Hidrobiología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa.

Asesoras:

Dra. Edith Cortés Barberena.

Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa.

Dra. Marcela Galar Martínez.

Laboratorio de Toxicología Acuática. Departamento de Farmacia. Instituto Politécnico Nacional, Zacatenco.

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Unidad Iztapalapa, aprobó la tesis que presentó:

MISAEEL HERNÁNDEZ DÍAZ.

El día 13 de diciembre del año 2018.

Miembros del Jurado.



Dra. Edith Cortés Barberena
Presidente.



Dra. Marcela Galar Martínez
Secretario.



Dr. Leopardo Manuel Gómez Oliván
Sinodal.



Dr. Juan Carlos Segoviano Ramírez
Sinodal.

Dedicatoria.

EL MAR...

Donde hay historias de amor
que nunca se escribieron,
donde las olas vienen y van
siempre trayendo dulces
recuerdos.

Escucho en una caracola el
susurro de tu voz,
te siento a mi lado, es la magia
del mar,
me acerca a ti, me arrastran las
olas...

El mar.
Lugar infinito, lejano horizonte
donde tú estás...

Arena fría que no me dice nada
pues las olas borraron
aquellas cosas que escribías
que terminaban en "te quiero"

El mar
Donde yo escribo estos versos
para ti, sin poderte olvidar.
Tú eres mi recuerdo, mi vida...

El mar...

A ti que, para hablar de amor
eres mi mayor inspiración.

En tu orilla paz puedo sentir,
alguien me dijo que en ti
encontró una razón para vivir.

¿A quién le importan los
problemas
si a tu lado, la vida
se transforma en un poema?

En mis penas
tu brisa me acuna
y en mis alegrías
sólo mirarte me emociona.

Me pierdo en tu inmensidad
y entre tus olas me dejo llevar.
No puedo sentir la soledad
porque siempre me queda el
mar.

Jéssica Arias Mingorance

Agradecimientos.

A mi abuelita, **Bernardina Ramírez Miranda**, el ser más maravilloso que he conocido, una confidente que jamás me ha abandonado, la compañera con la que reía y lloraba de mis éxitos y fracasos, un ángel que dejó este plano solamente para seguir cuidándome en esta carrera llamada vida. Te amaré siempre y te llevo en mi corazón Abue.

A mi madre, la **Sra. Rita Díaz Ramírez** quien gracias a su amor incondicional, fortaleza, apoyo en momentos de confusión y comprensión así como regaños de amor; me convirtieron en el hombre que soy. Gracias por sacarme adelante y siempre creer en mí. Te amo mami.

A mi familia hermosa, **Sarahí Hernández Díaz** quien, además de ser mi mejor amiga y compañera de videojuegos, me enseñó a creer en mí y a seguir mis sueños cuando dudaba. Gracias hermana. **Hobeth Hernández Díaz** por su apoyo en la transición de mi vida y consejos de crecimiento personal y profesional; y por darme uno de los regalos más grandes en mi vida junto a **Irma Rocío Espinosa Escobar**, mis sobrinos hermosos: **Sofía Yaretzi** y **Elían Itzae** con los que juego y cuido como mis más grandes tesoros. Finalmente a mi Padre **José Asunción Hernández Hernández** cuyas enseñanzas de vida me motivaron a seguir el camino del éxito.

A mis amigos, el **M. en B. José Roberto Jerónimo Juárez** por sus sabios consejos, abrazos, regaños y días de alegría, te quiero mucho amiguito. Al **Biol. José Ángel Vázquez Castro** por los momentos de felicidad y estrés que compartimos y que

reíamos cuando nos distraíamos bailando. A la **Biol. Alejandra Reyes Márquez** por esos días de tomar té e infinitas pláticas de superación personal y risas. A mis amigos de la licenciatura por acompañarme en esta travesía: **David I. Acosta**, **Karla García** (Lechi) e **Ivonne Pineda**, Los quiero mucho amigos. Finalmente a **Josué Sánchez Fuentes** por ser una persona maravillosa en mi vida quién impulsó y enseñó lo que la felicidad significa y resumo en una oración: Today, Tomorrow and Forever.

A la **Dra. Xochitl Guzmán García**, por su apoyo durante mi formación como hidrobiólogo, consejos en mi proyecto de servicio social y maestría, oportunidades, regaños y enseñanzas tanto académicas como de vida que, en su conjunto, me hicieron crecer como profesional y ver la pasión que hay en la investigación y en la vida acuática. Gracias por todo doctora Xochitl.

A la **Dra. Edith Cortés Barberena** por aceptar asesorarme en el proyecto de maestría siempre mostrando entusiasmo en sus enseñanzas, recomendaciones y consejos. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio para continuar con mi desarrollo profesional.

A la Dra. **Marcela Galar Martínez** por su asesoría, revisiones y enseñanzas siempre mostrando amabilidad y empatía que hacían que la investigación fuera un arte. Gracias doctora Marce por hacerme sentir parte de su equipo de investigación.

Al **Dr. Juan Carlos Segoviano Ramírez** por aceparme en su laboratorio dentro de una breve estancia de investigación para el aprendizaje y reconstrucción tridimensional de microfotografías del ensayo cometa.

A la **Dra. Mayra Pamela Becerra Amezcua** por su apoyo incondicional y consejos sobre ensayos hemolíticos y estandarización de técnicas celulares. A la **Biol. e H. T. Irma Hernández Calderas** por sus amables y entusiastas enseñanzas en la caracterización morfológica de células. Al **pasante de Doctorado Felipe de Jesús Muñoz González** por el apoyo en la base de datos EtMIRA y software IHB para este proyecto. Al **T.L.C. y pasante en Hidrobiología Brian Real Huescas** por su apoyo en la identificación celular y de alteraciones sanguíneas. Al **M. en C. Fernando Alberto Mares Guzmán** por su asesoría en los análisis estadísticos.

A la **M. en B. E. Ana María González Gutiérrez** por su asesoría y enseñanzas en la elaboración del ensayo cometa. Al **pasante en Medicina Daniel Fernando López Altamirano** por su apoyo en el uso del microscopio confocal y toma de microfotografías. Al **Dr. Eloy Gasca Pérez** por sus enseñanzas y consejos en el aprendizaje de técnicas de estrés oxidativo. A los jóvenes de **protección civil** por el apoyo incondicional en las prácticas de salvamento. Al **H. Ayuntamiento** por las facilidades otorgadas en el municipio de Tecolutla, Veracruz.

Al **CONACyT** por el apoyo económico para la elaboración de este proyecto. A la **comisión de la Maestría en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana** por aceptarme como alumno en la generación 16-O y el apoyo en este proyecto.

Índice General

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Antecedentes	6
Justificación	10
Área de estudio	11
Pregunta de Investigación	13
Hipótesis	13
Objetivo general	14
Objetivos particulares	14
Materiales y Métodos	15
Colecta de muestras	15
Parámetros fisicoquímicos, biológicos y morfométricos	15
Conteo de eritrocitos	16
Caracterización Histológica	16
Análisis de alteraciones (Histopatología)	17
Categorización de alteraciones	17
<i>Factor de Importancia (FI)</i>	17
<i>Intensidad de Reacción (IR)</i>	18
Índice de diagnóstico de salud (Índice de Reacción)	19
Daño del material genético (Ensayo cometa)	20
Diagnóstico de salud de los peces bagre (<i>Ariopsis felis</i>)	21
Resultados	22
Parámetros fisicoquímicos	22
Parámetros biológicos	23
Parámetros morfométricos	24
Conteo de eritrocitos	25
Caracterización Histológica	26
Análisis de alteraciones (Histopatología)	28
Categorización de alteraciones	30
<i>Factor de Importancia (FI)</i>	31
<i>Intensidad de Reacción (IR)</i>	32
Índice de Reacción Patrón (Irp)	35
Daño del material genético (Ensayo Cometa)	36
Diagnóstico de salud de los peces bagre (<i>Ariopsis felis</i>)	39
Discusión	41
Conclusiones	46
Bibliografía	48

Índice de Figuras

Figura 1. Pez bagre <i>Ariopsis felis</i> de Tecolutla Veracruz.	4
Figura 2. Mapa del municipio y estuario de Tecolutla, Veracruz.	12
Figura 3. Aspecto del pez bagre (<i>A. felis</i>) colectado en Tecolutla, Ver.....	23
Figura 4. Caracterización morfológica de células sanguíneas del pez bagre <i>A. felis</i>	27
Figura 5. Microfotografías de alteraciones en eritrocitos de peces bagre <i>Ariopsis felis</i> de Tecolutla, Veracruz.....	29
Figura 6. Porcentaje de la prevalencia de las alteraciones observadas en los peces bagre <i>A. felis</i> de Tecolutla, Veracruz.	33
Figura 7. Microfotografías que evidencian la presencia de cauda de cometas en eritrocitos.	36
Figura 8. Grafica de la frecuencia de los niveles de daño genético en eritrocitos de peces bagres (<i>Ariopsis felis</i>).....	37
Figura 9. Grado de daño en la serie roja de 10 peces bagre <i>Ariopsis felis</i> de Tecolutla, Veracruz.....	39
Figura 10. Nivel y porcentaje de daño en eritrocitos de bagres de Tecolutla, Veracruz.....	40

Índice de Tablas

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos obtenidos en la colecta.	22
Tabla 2. Parámetros morfométricos de los peces bagre <i>A. felis</i> colectados en Tecolutla, Veracruz.	24
Tabla 3. Concentración promedio de eritrocitos y desviación estándar en bagres <i>A. felis</i> de Tecolutla Veracruz.	25
Tabla 4. Categorías de las alteraciones y Factor de Importancia (FI) en eritrocitos de bagre.	31
Tabla 5. Porcentaje de la prevalencia de las alteraciones observadas en los peces bagre <i>A. felis</i> de Tecolutla, Veracruz.	32
Tabla 6. Intensidad de Reacción (IR) de acuerdo al porcentaje de prevalencia de las alteraciones los peces bagre <i>Ariopsis felis</i> de Tecolutla, Veracruz.	34
Tabla 7. Índice de reacción patrón (Irp) de 10 peces bagre a partir del cálculo del factor de importancia (FI) e intensidad de reacción (IR) de las 5 alteraciones categorizadas.	35
Tabla 8. Evaluación de la magnitud de daño genético y desviación estándar a partir de los niveles de daño en eritrocitos de bagres de Tecolutla, Veracruz.	38

Resumen

Las alteraciones en eritrocitos aportan información sobre el estado de salud de los peces así como del medio en el que se desarrollan. Sin embargo, estas alteraciones no han sido bien categorizadas de forma semicuantitativa. Es importante conocer la importancia patológica de las alteraciones en eritrocitos para generar protocolos de evaluación que puedan ser utilizados en programas de monitoreo ambiental. Por esta razón, el objetivo del trabajo fue categorizar alteraciones en eritrocitos del bagre *Ariopsis felis* con valores de referencia para establecer un diagnóstico de salud.

Se colectaron peces bagre en Tecolutla, Veracruz. Los organismos fueron anestesiados con benzocaína (5%) y se tomaron muestras sanguíneas con jeringas heparinizadas. Se realizó un recuento de eritrocitos en cámara Nuebauer. Asimismo, frotis sanguíneos fueron elaborados y teñidos con colorante de Giemsa. Los frotis se observaron y analizaron en 10 campos homogéneos con microscopio óptico. Posteriormente cada alteración fue evaluada de acuerdo a su importancia patológica y grado de diseminación para conocer el diagnóstico de salud de los bagres.

Los peces tuvieron, en promedio, 1.9×10^6 eritrocitos por mililitro. Las alteraciones categorizadas por su importancia patológica fueron: poiquilocitos, equinocitos e hipocromía como alteraciones moderadas reversibles (valor de 2) mientras que células blásticas y variación en la morfología nuclear corresponden a alteraciones severas irreversibles (valor 3).

Los bagres de Tecolutla, Veracruz presentaron diferentes grados de alteraciones que indican principios de anemia. Sin embargo, estas alteraciones no comprometen su estado de fisiológico actual pero, eventualmente, incrementarán los daños a su salud.

Abstract

Alterations in erythrocytes provide information of the health status in fish as well as the environment in which they develop. However, these alterations have not been well categorized in a semiquantitative way. It is important to know the pathological importance of alterations in erythrocytes to generate evaluation protocols that can be used in environmental monitoring programs. For this reason, the aim of this study was to categorize alterations in erythrocytes of the catfish *Ariopsis felis* with reference values to establish a health diagnosis.

10 catfish were collected in Tecolutla, Veracruz. The organisms were anesthetized with benzocaine (5%) and blood samples were taken with heparinized syringes. A count of erythrocytes was performed in the Neubauer chamber. Also, blood smears were prepared and stained with Giemsa stain. The smears were observed and analyzed in 10 homogeneous fields with an optical microscope. Subsequently each alteration was evaluated according to its pathological importance and degree of dissemination to know the health diagnosis of the catfish.

The fishes had, on average, 1.9×10^6 erythrocytes per milliliter. The alterations categorized by their pathological importance were: poikilocytes, equinocytes and hypochromia, has moderate reversible alterations (value of 2) while blast cells and variation in nuclear morphology correspond to severe irreversible alterations (value 3).

The catfish from Tecolutla, Veracruz showed different degrees of alterations indicating the principles of anemia. However, these alterations do not compromise their current physiological state but, eventually, they will increase the damage to their health.

Introducción

Las actividades humanas tienen un impacto negativo en el ambiente que conlleva a la contaminación de los cuerpos acuáticos. Son diversos los contaminantes que se pueden encontrar en los medios acuáticos, entre los que se encuentran los hidrocarburos, plaguicidas y metales pesados (Ansoar *et al.*, 2009). La ecotoxicología se encarga de estudiar las interacciones y efectos de los contaminantes tóxicos en los organismos acuáticos y terrestres, así como sus consecuencias en el ambiente (Bratosin *et al.*, 2016).

Los contaminantes presentes en un sistema pueden ser evaluados a través del monitoreo biológico. Las evaluaciones ecotoxicológicas son una de las principales herramientas, definidas como métodos que analizan células vivas, tejidos, organismos o comunidades para evaluar los efectos de la exposición con los productos químicos relacionados (Maceda *et al.*, 2015; Olivares *et al.*, 2014)

En la evaluación de los contaminantes, los peces han sido utilizados como indicadores de la calidad del agua en diversos países desde hace tiempo. Los peces son el grupo más diverso entre los vertebrados, sin embargo, muchas especies de agua dulce y marina se encuentran amenazadas por las actividades humanas. (Maceda *et al.*, 2015). Los organismos indicadores de los sistemas biológicos, tal como el pez bagre *Ariopsis felis* (cuyas características fisiológicas, morfológicas y comerciales lo hacen un buen organismo bioindicador) son de gran utilidad en el monitoreo de la contaminación (Figura 1).



Figura 1. Pez bagre *Ariopsis felis* de Tecolutla Veracruz.

El monitoreo biológico está bien representado en el campo internacional, sin embargo, en México los programas de monitoreo se encuentran en fase de desarrollo (Guzmán-García *et al.*, 2007). Los proyectos de investigación desarrollados en México, y particularmente en el Golfo de México en el municipio de Tecolutla Veracruz, agrupan respuestas macroscópicas, de condición y tisulares, dejando de lado las respuestas celulares (Guzmán-García *et al.*, 2007). Los datos de investigación e información sobre las respuestas tisulares y celulares en organismos acuáticos aún no han sido clasificadas ni almacenadas en bases de datos de una manera normalizada y sistematizada.

En México existen pocas bases de datos cuyo propósito es dar a conocer aspectos biológicos y morfológicos como: volúmenes de captura de peces, distribución espacial, índices de reproducción y otros aspectos ecológicos y económicos de tipo relacional entre las que se encuentran CONABIO, CCUD y la Base de Datos Ecotoxicológica para el Manejo Integral de los Recursos Acuáticos (EtMIRA, 2011). Aunado a lo anterior, existe el Banco de Tejidos del Estado de México como base de

datos nacional (2008), sin embargo, no existe una base que recopile información sobre el estado tisular y celular en organismos acuáticos.

Antecedentes

El laboratorio de Ecotoxicología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, está desarrollando una base de datos ecotoxicológica relacional (EtMIRA), cuya finalidad es presentar un sistema estructurado que facilita el acceso y el manejo de la información utilizando un modelo de tablas relacionales. Dicha base de datos compila información relevante obtenida a partir del análisis de las respuestas tisulares y celulares de organismos acuáticos recolectados, así como de muestras de órganos, genera información que puede ser utilizada en programas de biomonitoreo y de la contaminación acuática. (Guzmán-García *et al.*, 2007; Jerónimo-Jurez, 2013).

Las respuestas celulares funcionan como indicadores de sustancias tóxicas que han sido incorporadas de los organismos en el medio en el que se desarrollan. En este sentido, el análisis de la sangre de peces se recomienda para establecer diagnósticos de salud por la contaminación acuática (Witeska, Kondera y Szczygielska, 2011).

En los peces, las células sanguíneas son sensibles ante diversos agentes ambientales (Vazzana *et al.*, 2009; Valdebenito *et al.*, 2011; Yilmaz y Mutaf, 2015), respondiendo a estos con cambios en su morfología y variaciones citogenéticas, las cuales pueden ser analizadas a través de la histopatología y determinar si eventualmente el daño se refleja en tejidos y órganos a través de pruebas complementarias.

En este sentido, el ensayo cometa (electroforesis alcalina) resulta ser un biomarcador útil en estudios de alteraciones celulares así como en estudios ecotoxicológicos y para determinar la contaminación acuática debido que es un método rápido y sensible ante agentes genotóxicos, permite evidenciar rupturas en sitios lábiles del material genético (Singh *et al.*, 1988).

El análisis genotóxico, a través del ensayo cometa, así como los estudios histopatológicos, son herramientas que se recomiendan ampliamente en estudios ecotoxicológicos y que pueden ser aplicados en programas de monitoreo de la contaminación para establecer índices sobre el diagnóstico de salud en los peces (Zimmerli *et al.*, 2007; Witeska, Kondera y Szczygielska, 2011; Maceda *et al.*, 2015). Sin embargo, existen pocos estudios que categoricen o clasifiquen de manera ordenada las alteraciones de células sanguíneas en peces, como el tipo de alteraciones asociadas a su nivel de impacto patológico, o la gravedad de la lesión.

Estas alteraciones pueden ser de tipo reversible o irreversible (Bernet *et al.*, 1999; Zeitz y Sens, 2012). Las alteraciones relacionadas con la membrana y citoplasma del eritrocito, como la poiquilocitosis, equinocitosis e inclusiones citoplasmáticas, suelen ser reversibles debido a los mecanismos de reparación así como a la vida media de la célula lo que permite a los organismos generar nuevos eritrocitos.

Por otra parte, las alteraciones relacionadas con el material genético como los micronúcleos, lobulación del material genético y ruptura de los sitios lábiles son ejemplos irreversibles de daño genotóxico que eventualmente evidencian problemas en el desarrollo y fisiología de los peces.

La categorización, de acuerdo a Bernet *et al.*, (1999) ordena las respuestas tisulares en reacciones patrón que están estrechamente relacionadas con el impacto patológico. Sin embargo, estos criterios aún no han sido establecidos en alteraciones de las células sanguíneas, aún cuando estos elementos celulares expresan respuestas biológicas que pueden ser evaluadas de manera rápida y económica (Bernet *et al.*, 1999; Zimmerli *et al.*, 2007).

Existen protocolos para la evaluación de lesiones tisulares y órganos en peces a partir de la asignación de valores referenciales que indican su importancia patológica en términos numéricos. Las escalas utilizadas, que pueden ir de 0 a 3, se asocian al nivel de la alteración (Yilmaz y Mutaf, 2015). A pesar de esto, no se han asignado valores referenciales a las alteraciones en células sanguíneas para su uso en los diagnósticos de salud y protocolos para la evaluación de la contaminación acuática, generando con estos elementos una forma estandarizada de la evaluación tisular y una escala numérica que pueda ser de fácil interpretación en los programas del control de la contaminación (Bernet *et al.*, 1999; Maceda *et al.*, 2015).

A partir de la información antes mencionada, se puede dar paso a análisis de tipo semicuantitativo cuya información pueda ser estructurada dentro de una base de datos normalizada y sistematizada. Las ventajas de estructurar la información radican en que los resultados de los estudios de investigación pueden ser consultados y analizados en diferentes escalas de espacio y tiempo. Esta herramienta de consulta puede servir para reestablecer protocolos para determinar

la salud de los organismos acuáticos, así como su relación con la contaminación acuática (Bernet *et al.*, 1999; Guzmán-García *et al.*, 2007).

Justificación

En los programas de biomonitoreo se evalúan diferentes parámetros de salud en los organismos como: valores morfométricos, aspectos macroscópicos, evaluaciones tisulares y celulares. Sin embargo, no existen matrices que compilen esta información con el fin de tener una base de datos que permita la consulta de dichas evaluaciones.

La Base de Datos Ecotoxicológica tiene como finalidad la construcción de tablas que permitan la normalización y sistematización de datos biométricos que permitan hacer inferencias cuantitativas más precisas para estimar índices, valores de vulnerabilidad y valores de referencia que puedan ser utilizados para determinar el estado de salud de los organismos acuáticos. En este sentido, los peces aportan importante información a los programas de biomonitoreo, pero se ha dejado de lado el análisis en células sanguíneas, siendo éstas un indicador importante de la salud de los organismos.

La evaluación y categorización de las alteraciones sanguíneas, así como el establecimiento de valores de referencia que indiquen su grado de alteración e importancia patológica, no han sido establecidos en los estudios ecotoxicológicos y en el monitoreo biológico.

Área de estudio

Tecolutla comprende una importante zona turística ya cuenta con playas y geográficamente está ubicada en un punto cercano a la Ciudad de México. La cuenca del río Tecolutla se forma en las inmediaciones de los estados de Veracruz y Puebla con una extensión de 7 950.05 km², el polígono presenta una Latitud 20°28'48"-19°27'36" N, Longitud 98°14'24"-96°57'00" W.

La cuenca está rodeada por las sierras de Huachinango al este y Zacapoaxtla al sur (Arriaga *et al.*, 2009). El río Tecolutla tiene una extensión de 100 km aproximadamente. Atraviesa varios municipios Coyutla, Espinal, Papantla, y Gutiérrez Zamora, desembocando en Tecolutla (Figura 2).

Aunque existen pocos estudios de la calidad del agua, en estos se detecta la presencia de metales y plaguicidas así como coliformes totales y fecales. A partir del monitoreo de la cuenca, se establece que se encuentra en una escala regular (de acuerdo al rango de Brown 51-70) indicando que los desechos urbanos se depositan en el río (Arriaga *et al.*, 2009; Guevara *et al.*, 2014).

Sin embargo, es una región para la cual existen escasos estudios en cuanto a su riqueza faunística y la presencia de contaminantes tóxicos.

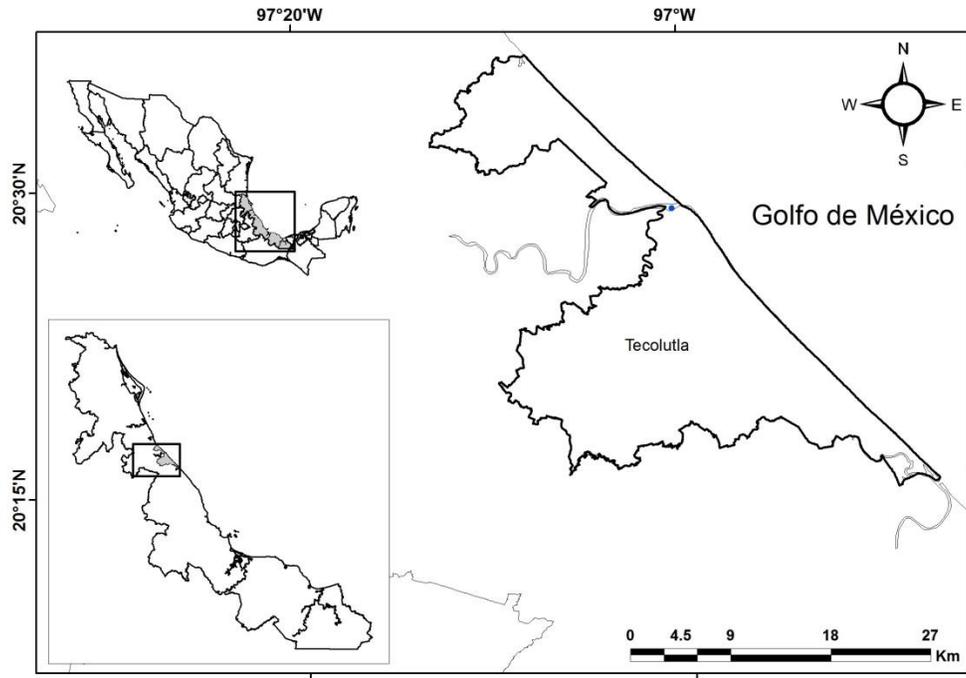


Figura 2. Mapa del municipio y estuario de Tecolutla, Veracruz (tomado de Jerónimo-Juárez et al., 2018:).

Pregunta de Investigación

¿Cuál es el estado de salud del bagre *Ariopsis felis* según la categorización de las alteraciones en células sanguíneas?

Hipótesis

Si las alteraciones en células sanguíneas del pez bagre *Ariopsis felis* pueden ser categorizadas con valores de referencia entonces se podrá conocer el grado de las alteraciones y el diagnóstico de salud de los organismos.

Objetivo general

Analizar las alteraciones en células sanguíneas del pez bagre *Ariopsis felis* y categorizarlas con valores de referencia para establecer un diagnóstico de salud.

Objetivos particulares

- Realizar una consulta en la base de datos Ecotoxicológica para determinar el número de preparaciones histológicas sanguíneas disponibles.
- Caracterizar la morfología de células sanguíneas y recuento de eritrocitos del pez Bagre *A. felis*.
- Detectar las alteraciones morfológicas y genotóxicas de los eritrocitos para definir si son reversibles o irreversibles.
- Asignar valores de referencia de acuerdo a la importancia patológica e intensidad de reacción de las alteraciones.
- Analizar y calcular los índices histopatológicos de las alteraciones para establecer el diagnóstico de salud en los bagres *Ariopsis felis*.

Materiales y Métodos

Recolecta de muestras

Se realizó una consulta en la Base de datos Ecotoxicológica para determinar el número de peces bagre (*Ariopsis felis*) para el estudio, así como el número de laminillas almacenadas. Posteriormente se cotejó el número de organismos que se utilizarían para el estudio y se llevó a cabo una colecta en Tecolutla, Veracruz (Padrós, 2005). Para realizar el análisis, a cada organismo se le extrajo sangre periférica usando jeringas de 3 mL previamente heparinizadas. Las muestras fueron transportadas dentro de una hielera a 4°C para su procesamiento histológico en el laboratorio.

Parámetros fisicoquímicos, biológicos y morfométricos

Se tomaron parámetros fisicoquímicos del agua: pH, salinidad y temperatura con ayuda de un multianalizador marca HACH® modelo DR/2000s. Los datos se concentraron en los formatos del laboratorio de Ecotoxicología.

Por otra parte, se realizó una evaluación macroscópica de cada organismo colectado para obtener los parámetros biométricos de un microscopio estereoscópico, se analizó la presencia de ectoparásitos, hongos, vermes, perforaciones o lesiones en tejido blando. El registro de cada parámetro se consideró para la selección de los organismos, aquellos peces que no presentaron ninguno de los parámetros antes mencionados, fueron los seleccionados para la toma de muestras sanguíneas.

Posteriormente, a los peces seleccionados se les tomaron datos morfométricos con un ictiómetro y una balanza marca OHAUS® modelo CT6000-S. Los parámetros registrados fueron longitud total, longitud patrón, altura, ancho y peso.

Los parámetros fisicoquímicos, biológicos y morfométricos fueron registrados en la base de datos EtMIRA del laboratorio de Ecotoxicología para su consulta.

Conteo de eritrocitos

Para el conteo de eritrocitos, se tomó 1 mL de sangre de los 10 organismos colectados y se realizaron diluciones 1:100. Posteriormente se tomaron 10µL de la muestra diluida y se colocaron en una cámara de Neubauer. Se realizó el recuento en todos los organismos y las concentraciones fueron registradas a una base de datos en Excel para su interpretación.

Caracterización Histológica

A partir de las muestras sanguíneas se realizaron frotis colocando 10 µL de sangre en un porta objetos y realizando un extendido con ayuda de un cubre objetos. 20 frotis fueron elaborados (2 réplicas por organismo) y se fijaron con alcohol al 96% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se colocaron una hora en alcohol al 96% y después se dejaron secar durante 5 minutos. Los frotis fijados se colocaron durante una hora en colorante de Giemsa. Terminando este paso, se dejaron secar y se introdujeron rápidamente en agua acética para posteriormente lavarlos con agua corriente. Finalmente los frotis se colocaron en alcohol absoluto durante 1 minuto y consecutivamente se colocaron en xilol por 3 minutos.

Los frotis fueron observados en un microscopio óptico marca CARL ZEISS® Primo Star. Se tomaron microfotografías de los eritrocitos, linfocitos, monocitos y otros tipos celulares observados para su caracterización con una cámara acoplada marca CANON® modelo Power Shot G10.

Análisis de alteraciones (Histopatología)

Se revisaron 20 frotis en un microscopio invertido Axio Observer Z1 Apotome. Se tomaron microfotografías aleatorias en 10 campos a 100X de cada organismo para reconocer y cuantificar las alteraciones observadas.

Las microfotografías fueron analizadas en el programa Stepanizer e Image-J 1.50i para determinar el número de alteraciones encontradas. Posteriormente las alteraciones fueron medidas y categorizadas de acuerdo a un protocolo de análisis de extendidos sanguíneos de peces elaborado para este proyecto.

Categorización de alteraciones

Para la categoría de las alteraciones se tomaron los criterios propuestos por Bernet (1999) y Zeitz y Sens (2012) de acuerdo a la capacidad en que una alteración es reversible o irreversible.

Factor de Importancia (FI)

A cada una de las alteraciones categorizadas, se les asignó un valor de acuerdo a su importancia patológica (reversible e irreversible), propuesta por Bernet (1999) donde, una alteración mínima (reversible) tiene un valor de 1, moderada (reversible) un valor de 2 y severa (irreversible) un valor de 3.

Intensidad de Reacción (IR)

Posteriormente a cada alteración detectada y categorizada se le asignó una intensidad de reacción (IR), según el grado de diseminación de las alteraciones observadas en el extendido sanguíneo. La intensidad de reacción se evaluó de acuerdo con el porcentaje de diseminación de una alteración donde 0 se considera sin cambios (0-5%), ocurrencia leve 2 (5-30%), ocurrencia moderada 4 (40-60%) de mínima a moderada ocurrencia y 6 (70-100%) de severa ocurrencia. Una vez categorizadas las alteraciones, a partir de su importancia patológica y su intensidad de reacción se construyó una matriz con los datos obtenidos para el cálculo de índices.

Índice de diagnóstico de salud (Índice de Reacción)

Los resultados obtenidos del análisis de alteraciones en eritrocitos de 10 peces bagre fueron concentrados en una matriz. Se agregó el número del pez al que se le tomó la muestra sanguínea (No. de organismo) así como la clave de la laminilla observada (frotis).

Una vez en la base de datos, a partir del software "IINDEX-PH: Índice de impacto de contaminación y salud", se calculó el índice de reacción, es decir, el estado en el que se encuentra afectado el tejido sanguíneo de los 10 bagres a partir de la siguiente fórmula:

$$Irp = \sum_{alt} (a_{rp\ alt} \times w_{rp\ alt})$$

Dónde: ***Ir_p***= Índice de reacción patrón, ***alt***= alteración, ***a***=intensidad de reacción (diseminación de la alteración), ***w***= factor de importancia (importancia patológica).

Daño del material genético (Ensayo cometa)

Por otra parte, se realizó la técnica del ensayo cometa con sangre de 7 peces bagres. Se tomaron 150 μL de agarosa regular y se colocaron en un portaobjetos, después de que se enfriara, se tomaron 70 μL de agarosa con bajo punto de fusión (0.5%) y 30 μL de muestra completa sanguínea de los peces bagre que se colocaron en el mismo portaobjetos. La laminilla con agarosas y sangre completa se dejó enfriar durante 20 minutos para que, posteriormente, se colocara otra capa de agarosa regular. 21 laminillas (3 réplicas por pez) fueron elaboradas y se dejaron 1 hora en solución de lisis. A continuación se realizó una electroforesis en una cámara horizontal de las 21 laminillas a 25 V y 300 mA durante 20 min. Posteriormente 14 laminillas se tiñeron con Syto-Green13 y se observaron en un microscopio de epifluorescencia marca OLYMPUS® modelo BX41 con un objetivo de 20X para la observación de los cometas. Se tomaron microfotografías de cometas, los cuales fueron medidos y analizados en el software Carl Zeiss ® Axio Vision 40V versión 4.8.0.0.

Por otra parte, 7 laminillas fueron teñidas con 20 μL de yoduro de propidio y se observaron en un microscopio vertical Axio Imager confocal LSM 710 NLO (multifótonico) y se realizaron reconstrucciones en 3D de los cometas.

Los valores de referencia del ensayo cometa para categorizar y determinar el grado de daño genotóxico fueron los propuestos por Singh *et al.*, 1988 y utilizados en peces por Brugés y Reguero (2007) de acuerdo a la longitud de la cauda del cometa contando 100 células por pez que se clasifican en niveles de daño donde: No genotóxico= estado 0 (0-24 μm), ligeramente genotóxico= estado 1 (25-32 μm),

moderadamente genotóxico= estado 2 (33-40 μm), altamente genotóxico= estado 3 (41-53 μm) y extremadamente genotóxico= estado 4 (mayor a 53 μm).

La frecuencia de la magnitud de daño fue expresada en unidades arbitrarias (UA), con valoraciones posibles en un rango de 0-400, de acuerdo a la siguiente fórmula:

CTM (conteo total de la muestra) = [(% de células en clase 0) x 0] + [(% de células en clase 1) x 1] + [(% de células en clase 2) x 2] + [(% de células en clase 3) x 3] + [(% de células en clase 4) x 4].

Diagnóstico de salud de los peces bagre (*Ariopsis felis*)

A partir del índice de reacción (Irp) y del grado de daño genotóxico se obtuvo el diagnóstico de salud de cada uno de los peces bagre. Finalmente se realizó un promedio de los 10 bagres analizados para determinar el nivel de contaminación acuática según Zimmerli *et al.*, (2007) a través de una escala donde un índice de reacción <10= Normal (Sistemas acuáticos no contaminados), 11-12=Leve y 21-30= Moderado (Sistemas poco contaminados), 31-40=Alto y >40 Severo (Sistemas altamente contaminados).

Resultados

Parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos del agua tales como el pH, la salinidad y la temperatura indican que los peces bagre (*A. felis*) colectados en Tecolutla, Veracruz, se desarrollan en sistemas acuáticos salobres estuarinos. Los datos se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos obtenidos en la colecta.

Lugar de colecta	Geoposición	pH	Salinidad (ppm)	Temperatura (°C)
Tecolutla, Veracruz	N 20° 28' 392" W 97° 00' 296"	7	3	23

Parámetros biológicos

Dentro de la evaluación macroscópica de los peces colectados, se identificaron y seleccionaron 10 peces bagre (*A. felis*) los cuales, dentro de los parámetros biológicos de las muestras, no presentaron ectoparásitos, hongos, vermes, perforaciones o lesiones en su tejido blando. Se obtuvo de cada organismo 3 mL de sangre periférica (Figura 3).



Figura 3. Aspecto del pez bagre (*A. felis*) colectado en Tecolutla, Ver.

Parámetros morfométricos

Los datos morfométricos de los peces colectados fueron en promedio 34.6 cm de longitud total (Long T.), 29.6 cm en longitud patrón (Long P.), 5.6 cm de alto, 5.8 cm de ancho y 381 g en su peso. El promedio de las medidas morfométricas indican que los organismos se encuentran en estado juvenil-adulto (tabla 2) y que no presentan alteraciones macroscópicas.

Tabla 2. Parámetros morfométricos de los peces bagre *A. felis* colectados en Tecolutla, Veracruz.

No. organismo	Long T. (cm)	Long P. (cm)	Altura (cm)	Ancho (cm)	Peso (g)
1	37	31	7	6.5	422.5
2	41	34	6.5	7	526
3	33	28	4.5	6	321
4	34	30.5	6.5	6	379
5	37	32.5	5.5	7	390
6	36	30.5	6	7	462.5
7	36	30.5	5	6	335
8	28	24	4.7	3.7	186.5
9	27	22.5	4.6	3.6	169.1
10	37	33	6.2	6	618.7
Promedio	34.6±4.2	29.65±3.7	5.65±0.9	5.88±1.2	381.03±139.2

Conteo de eritrocitos

El recuento de eritrocitos de los 10 organismos colectados mostró que, en promedio, los peces bagre tiene una concentración de eritrocitos de 1.93×10^6 células por mililitro. Los organismos (2 y 4) que presentaron las concentraciones de eritrocitos más bajos fue de 1.84×10^6 mL y 1.82×10^6 mL respectivamente. Otros organismos (1, 6 y 10) tuvieron un conteo de eritrocitos de 2.01×10^6 mL, 2.01×10^6 mL y 2.03×10^6 mL (tabla 3).

Tabla 3. Concentración promedio de eritrocitos y desviación estándar en bagres *A. felis* de Tecolutla Veracruz.

No. organismo	Cel/mL
1	2.01
2	1.84
3	1.93
4	1.82
5	1.99
6	2.01
7	1.91
8	1.95
9	1.94
10	2.03
Promedio	1.939
D.S.	± 0.067

Caracterización Histológica

Se caracterizaron células sanguíneas (eritrocitos, linfocitos y monocitos) de los 10 peces bagres colectados. Se determinó que los eritrocitos miden entre 12 y 15 μm , los cuales presentan forma ovoide con un citoplasma color rosa pálido y un núcleo semi-condensado y redondo color morado (Figura 4-A).

Los linfocitos midieron entre 8 y 12 μm y presentaron un núcleo abundante y un citoplasma en menor proporción en relación con el núcleo (Figura 4-A y B).

Los monocitos midieron entre 14 y 16 μm presentando pequeñas proyecciones membranales (seudópodos), el núcleo fue abundante y su relación citoplasmática fue menor (Figura 4-C y D).

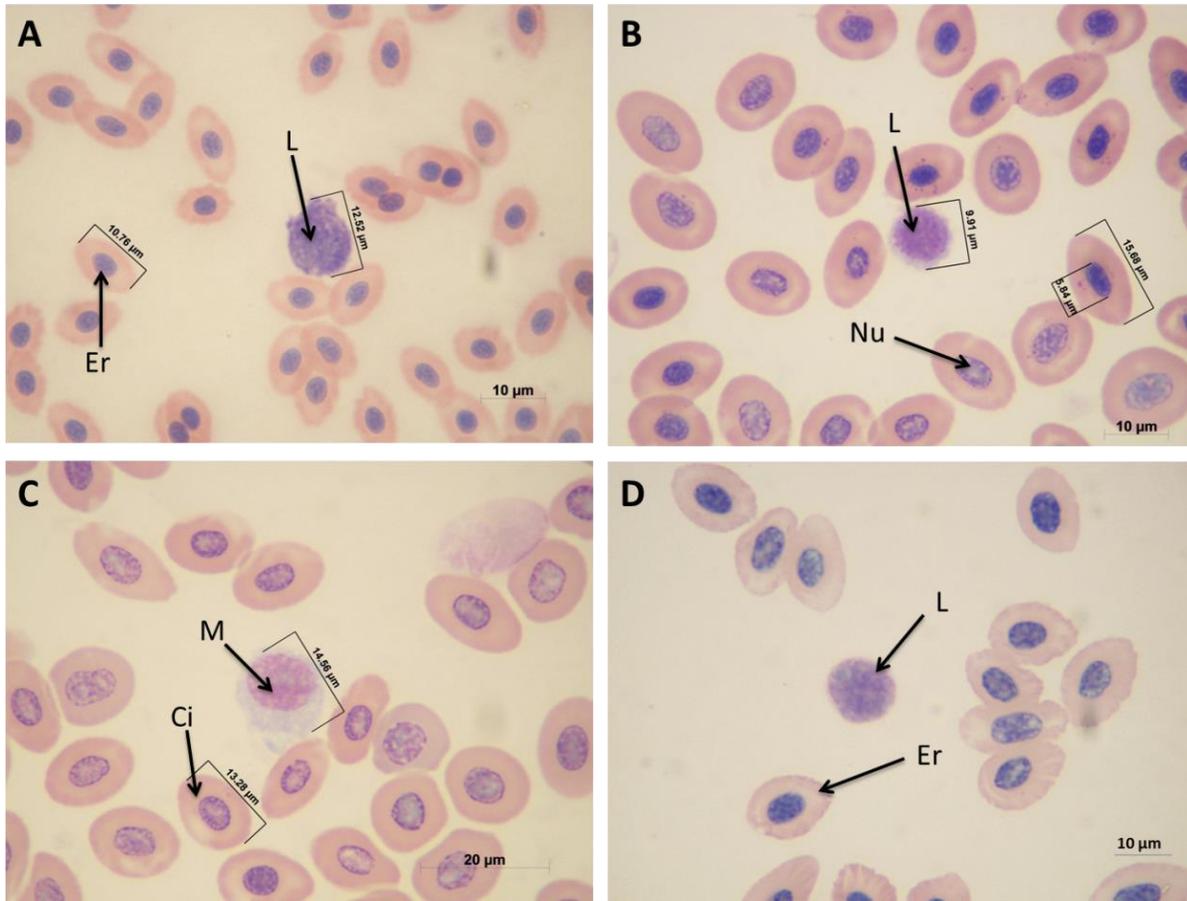


Figura 4. Caracterización morfológica de células sanguíneas del pez bagre *A. felis*. En A se observan eritrocitos (Er) y linfocitos (L). En B se observa el núcleo de eritrocitos (Nu) y linfocito (L). En C se observa un monocito (M) y citoplasma de eritrocitos (Ci) y en D un linfocito (L) y eritrocitos (Er).

Análisis de alteraciones (Histopatología)

Dada la abundancia y fácil reconocimiento de los eritrocitos se presentan los cambios histopatológicos de estas células. Fueron evidentes alteraciones en la membrana (Me), citoplasma (Ci) y núcleo (Nu) de eritrocitos (Figura 5-A). Estos cambios se han reportado como: poiquilocitosis, equinocitosis, eritrocitos hipocrómicos, variaciones en la morfología nuclear (VMN) y células blásticas.

La poiquilocitosis (PQ) y la equinocitosis (EQ) fueron alteraciones que afectaron la membrana de los eritrocitos (Figura 5-B y C). Los eritrocitos hipocrómicos (HC) se observaron principalmente en el citoplasma (Figura 5-E).

Por otra parte, la variación en la morfología nuclear (VMN) fue evidente en la condensación de la cromatina (Figura 5-D). Finalmente se detectó la presencia de algunas células blásticas (BL) (Figura 5-F).

A pesar de reconocer las alteraciones, se desconoce el impacto de estas en la salud de los organismos acuáticos, por ello, se procedió a establecer categorías que permitan elucidar el diagnóstico de salud.

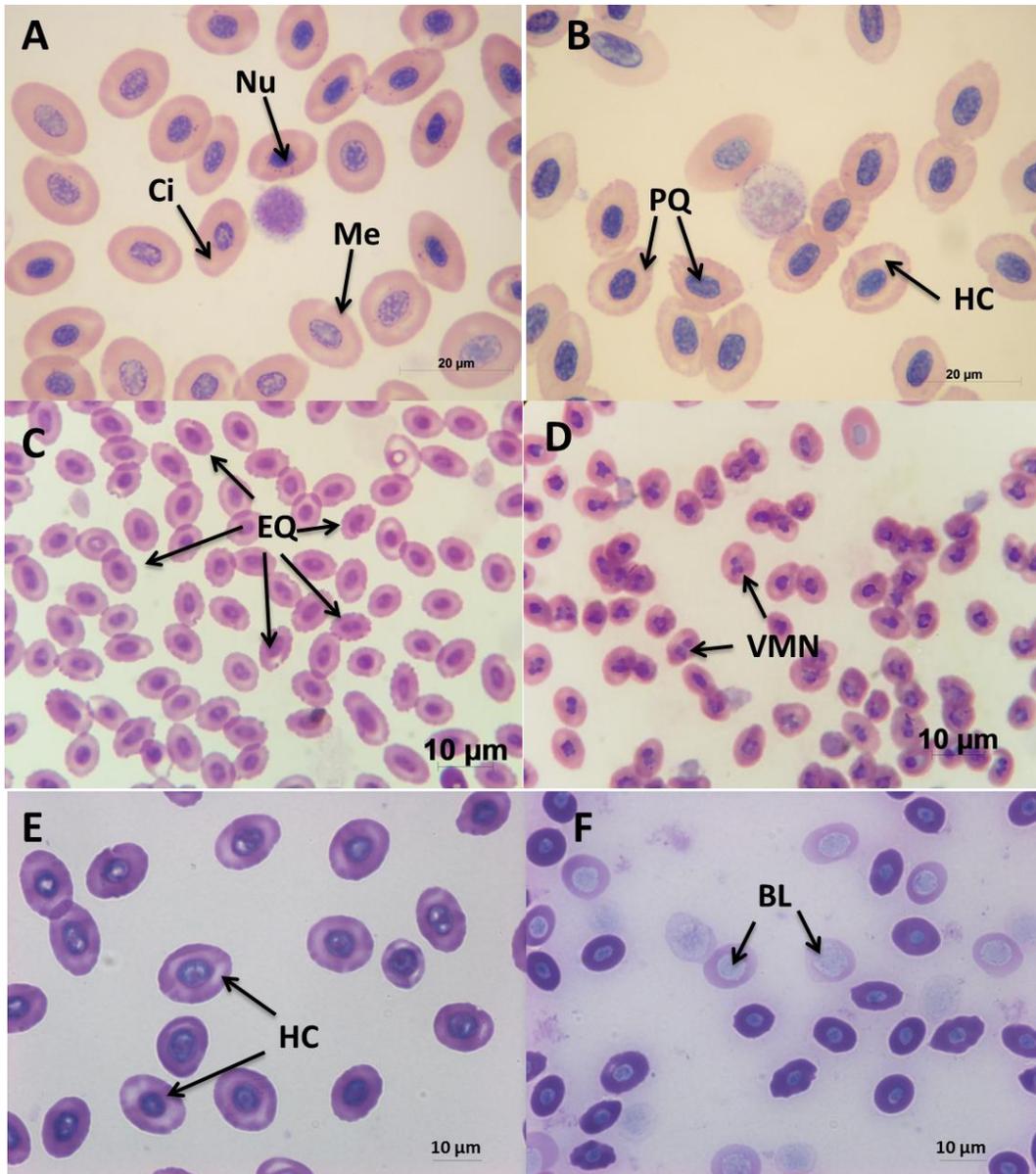


Figura 5. Microfotografías de alteraciones en eritrocitos de peces bagre *Ariopsis felis* de Tecolutla, Veracruz. En A observa la membrana, citoplasma y núcleo. En B poiquilocitos (PQ) y un eritrocito hipocrómico (HC). En C se observan equinocitos (EQ). En D eritrocitos con variaciones en la morfología del núcleo (VMN). En E eritrocitos hipocrómicos (HC) y en D células blásticas (BL).

Categorización de alteraciones

Las alteraciones en eritrocitos de peces bagre fueron categorizadas dependiendo si son reversibles o no a partir de los criterios de Bernet *et al.*, (1999) y Zeitz y Sens, (2012).

La poiquilocitosis y equinocitosis se presentan en anemias tempranas, exposiciones a tóxicos o desnutrición (Witeska *et al.*, 2011; Zeitz y Sens, 2012 y Gill y Pant, 1985) por lo que se categorizan como alteraciones reversible con un grado de importancia moderado

Por otra parte, la hipocromía se considera como reversible con un grado de importancia moderado ya que se presenta en situaciones donde existe anemia temprana por deficiencia de hierro, envenenamiento por metales o factores de maduración (Witeska *et al.*, 2011; Zeitz y Sens, 2012 y Gill y Pant, 1985).

En la variación de la morfología nuclear (VMN) el material genético puede presentar descondensación de la cromatina así como fragmentación y lobulación del núcleo provocados por metales pesados, plaguicidas, virus, etc; correspondiendo estas alteraciones a un grado de importancia patológica severo irreversible (Witeska *et al.*, 2011; Zeitz y Sens, 2012 y Gill y Pant, 1985).

Finalmente, la presencia de células blásticas, en bajas concentraciones no provocan cambios fisiológicos importantes, mientras que en concentraciones altas se relaciona con problemas en la médula ósea o daño en órganos hematopoyéticos por lo cual, se categorizan como una alteración irreversible con un grado de importancia severo (Witeska *et al.*, 2011; Zeitz y Sens, 2012 y Gill y Pant, 1985).

Factor de Importancia (FI)

El factor de importancia patológica para poquilocitos, equinocitos e hipocromía corresponden a un factor tipo 2 ya que son alteraciones de importancia moderada reversibles mientras que la variación en la morfología nuclear y las células blásticas presentan un factor de importancia de tipo 3 debido a que son de importancia severa e irreversibles (tabla 4).

Tabla 4. Categorías de las alteraciones y Factor de Importancia (FI) en eritrocitos de bagre.

Categoría de Alteración	Grado de Importancia	Alteración	Factor de Importancia (FI)
Reversible	Moderada importancia	Poquilocitos	2
Reversible	Moderada importancia	Equinocitos	2
Reversible	Moderada importancia	Hipocromía	2
Irreversible	Severa importancia	VMN	3
Irreversible	Severa importancia	Células blásticas	3

Intensidad de Reacción (IR)

El bagre 1 tuvo un porcentaje de prevalencia del 39% en la variación de la morfología nuclear (VMN). El bagre 2 presentó un 44% de equinocitos, mientras que el bagre 3 obtuvo un 31% de prevalencia en la VMN. El bagre 4 y 5 presentaron un mayor porcentaje en poiquilocitosis con un 31% y 55% respectivamente (tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de la prevalencia de las alteraciones observadas en los peces bagre *A. felis* de Tecolutla, Veracruz.

Alteraciones	Prevalencia por organismo (%)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Poiquilocitos	25	24	24	30	30	30	30	30	30	30
Equinocitos	0	44	44	15	15	15	15	15	15	15
Hipocromía (deficiencia de Hierro)	34	17	17	8	8	8	8	8	8	8
Variación en la morfología nuclear	39	12	12	30	30	30	30	30	30	30
Células blásticas	2	3	3	16	16	16	16	16	16	16

Por otra parte, el bagre 6 presentó 39% para poiquilocitosis y VMN mientras que el bagre 7 para esta última alteración obtuvo un 28%. La prevalencia de poiquilocitosis fue de 50% y 42% para el pez 8 y 9 respectivamente. Finalmente el bagre 10 presentó una mayor prevalencia en la VMN con un 31% (Figura 6).

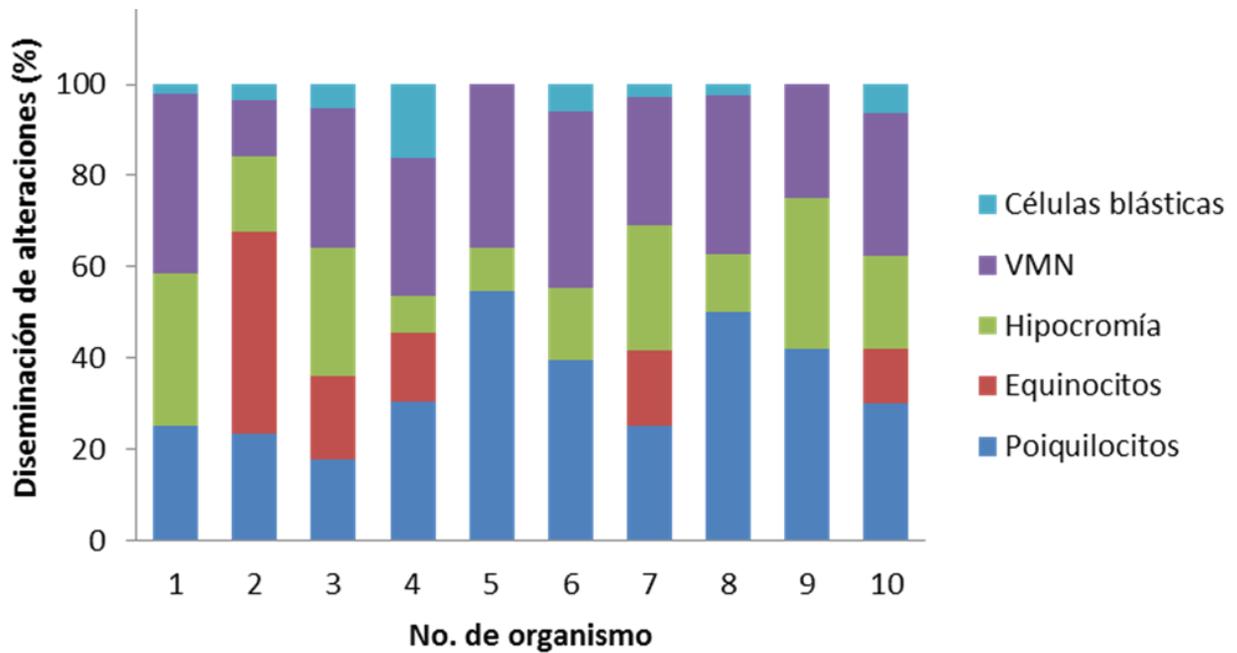


Figura 6. Porcentaje de la prevalencia de las alteraciones observadas en los peces bagre *A. felis* de Tecolutla, Veracruz.

A partir del porcentaje de diseminación, se asignó la intensidad de reacción (IR) en los bagres utilizando valores que van de 0 a 6 según el porcentaje. Para poiquilocitosis, la intensidad de reacción más alta (valor de 6) corresponde al bague 8. La IR para equinocitos más alta fue en el bague 2. Los peces 1, 5, 6, 8 y 9 no presentaron equinocitos. Por otra parte, la intensidad de reacción para hipocromía se presentó en el bague 3 y 9 con valores de 4.

En la variación de la morfología nuclear, la IR con valor de 4 se presentó en los organismos 1, 3, 6, 7, 8 y 10. Finalmente las células blásticas tienen una intensidad de reacción baja (valor de 2) que se presentó en todos los organismos excepto en el bague 1, 5 y 9 (tabla 6).

Tabla 6. Intensidad de Reacción (IR) de acuerdo al porcentaje de prevalencia de las alteraciones los peces bague *Ariopsis felis* de Tecolutla, Veracruz.

Matriz de Intensidad de Reacción (IR) por organismo																				
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
Alteraciones	(%)	IR																		
Poiquilocitos	25	2	23	4	18	2	30	2	55	4	39	4	25	2	50	6	42	4	30	4
Equinocitos	0	0	44	6	18	2	15	2	0	0	0	0	17	2	0	0	0	0	12	2
Hipocromía	34	2	17	2	28	4	8	2	9	2	16	2	27	2	13	2	33	4	20	2
VMN	39	4	12	2	31	4	30	2	36	2	39	4	28	4	35	4	25	2	31	4
células blásticas	2	0	3	2	5	2	16	2	0	0	6	2	3	2	3	2	0	0	6	2

Obteniendo el Factor de Importancia (FI) e Intensidad de Reacción (IR) de las 5 alteraciones observadas en los 10 bagres de Tecolutla, Veracruz, se calculó el Índice de reacción patrón (Irp).

Índice de Reacción Patrón (Irp)

El índice de reacción patrón (Irp) permitió estimar el grado de daño de la serie roja (eritrocitos) de cada organismo a partir de la sumatoria del Factor de Importancia (FI) por la Intensidad de Reacción (IR) de cada alteración observada en los eritrocitos de los bagres.

Se calcularon 10 índices en total correspondientes a cada pez bagre analizado por el software histopatológico (IHB). El valor del índice más bajo fue de 18 que corresponde al bagre 5 mientras que el más alto fue de 36 para el bagre 2 (tabla 7).

Tabla 7. Índice de reacción patrón (Irp) de 10 peces bagre a partir del cálculo del factor de importancia (FI) e intensidad de reacción (IR) de las 5 alteraciones categorizadas.

Alteración	Factor Importancia (FI)	Intensidad de reacción (IR) (No. de organismo)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Poiquilocitos	2	2	4	2	2	4	4	2	6	4	4
Equinocitos	2	0	6	2	2	0	0	2	0	0	2
Hipocromía	2	2	2	4	2	2	2	2	2	4	2
VMN	3	4	2	4	2	2	4	4	4	2	4
Células blásticas	3	0	2	2	2	0	2	2	2	0	2
	Índice de Reacción Patrón (Irp)	20	36	34	24	18	30	30	34	22	34

Daño del material genético (Ensayo Cometa)

Los peces bagre de Tecolutla, Veracruz presentaron diferentes niveles de daño genético en sus eritrocitos. La cauda de los cometas evidenció valores de daño que van de 0 a 4 y presentan longitudes desde 13.19 μm a 41.62 μm (Figura 7).

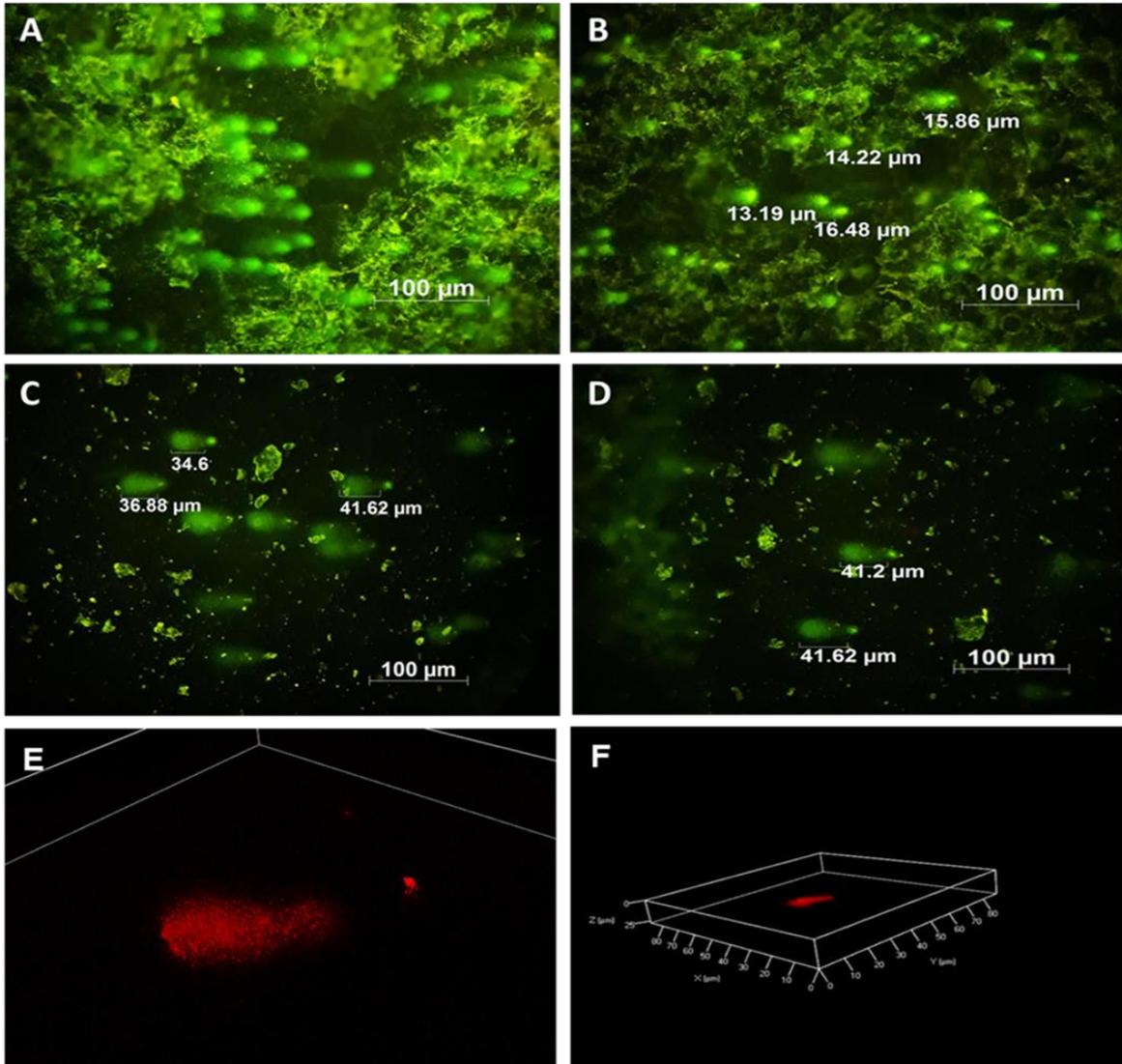


Figura 7. Microfotografías que evidencian la presencia de cauda de cometas en eritrocitos. En A se observa un campo a 20X de cometas. En B cometas con nivel de daño 1. En C y D cometas con nivel de daño 4. En E y F se observa un arreglo fotográfico de un cometa observado en un microscopio confocal multifotónico

Se observó que la frecuencia en los niveles de daño genético fue diferente en los peces. El bagre 2 y 3 tuvieron niveles 0 a 1 con una media de 0.85 y 0.56 respectivamente. Los organismos 1 y 4 presentaron niveles de daño entre 2 y 3 con una media de 2.56 y 2.66. Para el bagre 5, los niveles de daño van de 2 a 4 con una media de 2.96 mientras que el 6 presentó niveles de 1 y 2 con una media de 1.75. Finalmente, el organismo 7 presentó un nivel de daño 0 con una media de 0.01 (Figura 8).

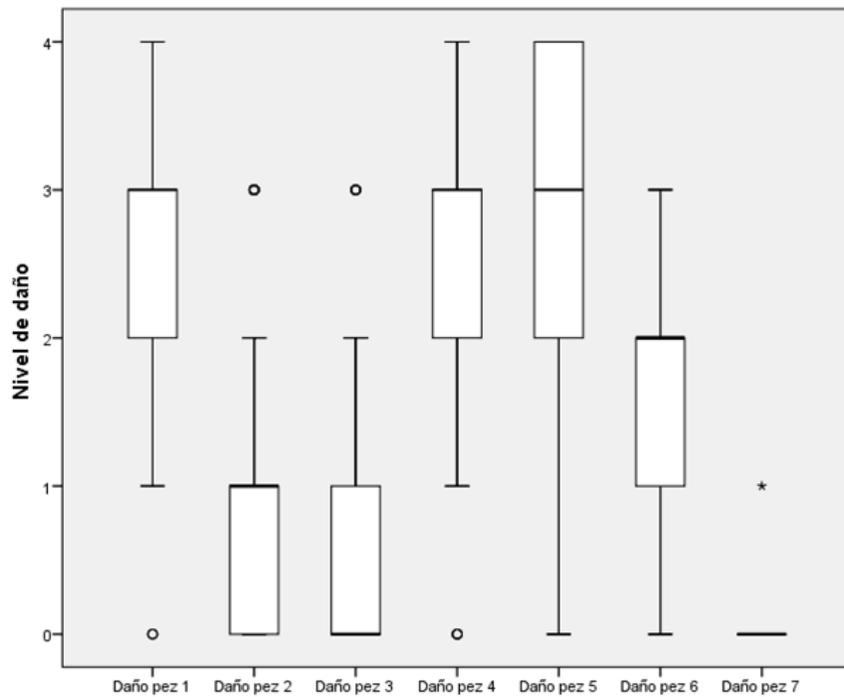


Figura 8. Gráfica de la frecuencia de los niveles de daño genético en eritrocitos de peces bagre (*Ariopsis felis*).

A partir de la frecuencia de los niveles de daño, se evaluó el la magnitud de daño genético a través de la fórmula del conteo total de muestra. El bagre 7 presentó una magnitud de 1, siendo este el de menor valor. Los organismos 3 y 2 presentaron valores de 56 y 85 mientras que el 6 tuvo una magnitud de daño de 174 UA. Finalmente los organismos 1, 4 y 5 tuvieron una magnitud de daño de 258, 266 y 296 UA respectivamente (tabla 8). Los peces con valores bajos representan poco daño en el material genético mientras que los valores intermedios y altos reflejan estados moderados y altamente genotóxicos en los eritrocitos de los bagres.

Tabla 8. Evaluación de la magnitud de daño genético y desviación estándar a partir de los niveles de daño en eritrocitos de bagres de Tecolutla, Veracruz.

No. Organismo	Estado (%)					CTM (UA)
	0	1	2	3	4	
1	2	7	33	47	11	258 ±19.1
2	47	31*	12	10	0	85 ±18.8
3	61	27	7	5	0	56 ± 25.1
4	3	4	25	60*	8	266 ± 24.0
5	1	5	21	43	30*	296 ± 17.4
6	2	31*	58*	9	0	174 ± 24.5
7	99*	1	0	0	0	1 ± 44.1

En resumen, los resultados demuestran que los niveles de daño más frecuentes en el material genético de los eritrocitos de los bagres analizados estuvieron entre moderado y altamente genotóxicos.

Diagnóstico de salud de los peces bagre (*Ariopsis felis*)

Para establecer el diagnóstico de salud de los bagres de Tecolutla, Veracruz, se consideró el grado de daño de la serie roja obtenido a partir de los índices de reacción patrón (Irp) calculados. Se observa que 3 organismos presentaron valores entre 20 y 22 mientras que 2 bagres tuvieron un índice de 30. Por otra parte, 3 organismos presentaron un índice de 34 y el bagre 2 presentó el grado de daño más alto del lote de organismos con un valor de 36 en la serie roja. En promedio, los bagres tienen un índice general de 28. Al ordenar estos datos, la tendencia se muestra en la Figura 9.

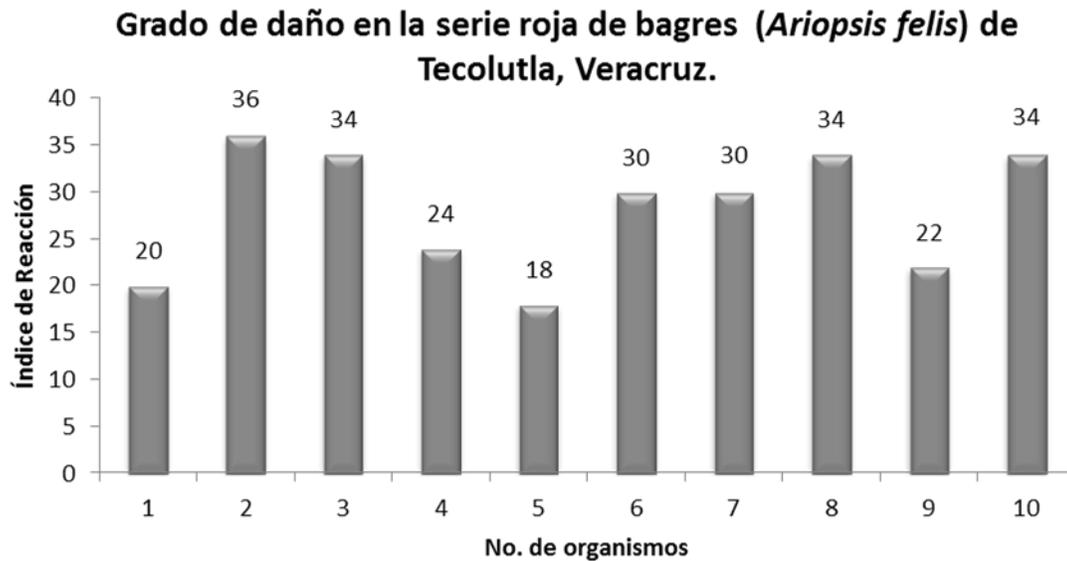


Figura 9. Grado de daño en la serie roja de 10 peces bagre *Ariopsis felis* de Tecolutla, Veracruz.

Los índices de reacción patrón expresan el nivel de impacto que presentan los bagres respecto al porcentaje de daño en los eritrocitos. En promedio, los 10 bagres presentaron un índice de 28.2 (Figura 10) y de acuerdo a la escala propuesta por Zimmerli *et al.*, (2007), estos peces se encuentran en un nivel moderado lo que corresponde a sistemas acuáticos poco contaminados.

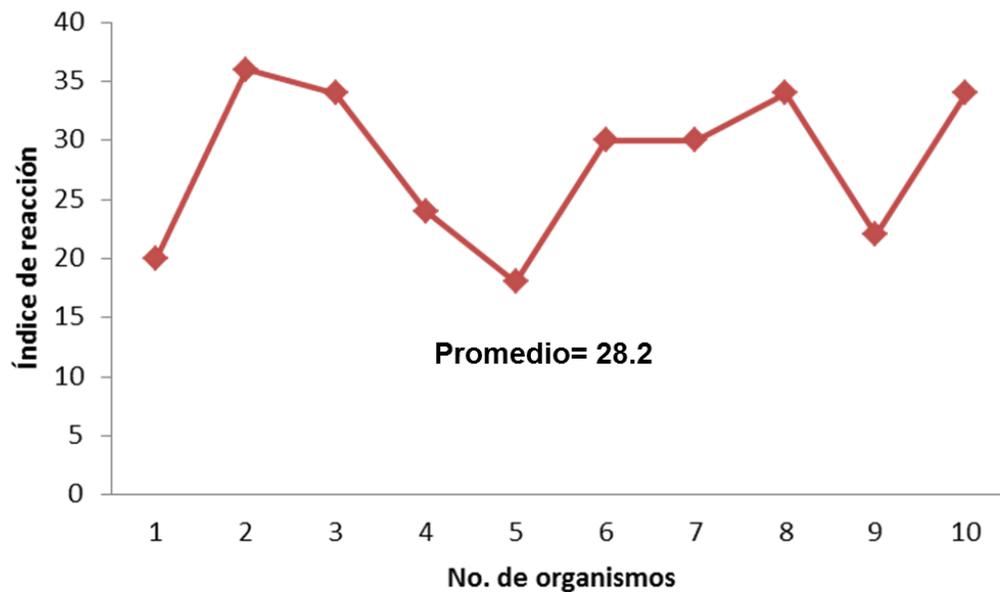


Figura 10. Nivel y porcentaje de daño en eritrocitos de bagres de Tecolutla, Veracruz.

De acuerdo con la concentración de eritrocitos, así como del índice histopatológico y la frecuencia de daño en el material genético, se observa que los bagres *Ariopsis felis* de Tecolutla, Veracruz, presentan alteraciones con una importancia patológica de nivel 3. Sin embargo la diseminación de no representa un estado de severa ocurrencia. Esto indica que los organismos no presentan aún un riesgo en su salud pero, eventualmente, pueden provocar daño en otros órganos así como poner en riesgo el estado fisiológico de los bagres.

Discusión

Los parámetros fisicoquímicos registrados en Tecolutla, Veracruz indican que los peces bagre *Ariopsis felis* se desarrollaron en un ambiente estuarino favoreciendo su crecimiento y desarrollo (Wang y Walker, 2011; Wakida-Kusunoki y Amador del Ángel, 2017 y Jones *et al.*, 1978). Por esta razón no se registraron daños en los organismos como parásitos, malos olores u otro parámetro biológico asociado. Esta especie se distribuye en zonas costeras desde el norte de California a través del Golfo de México: Veracruz, Tabasco y la península Yucatán (Wakida-Kusunoki y Amador del Ángel, 2017). A pesar de que los parámetros biológicos medidos indican que los organismos colectados no estaban afectados, existen reportes en Tecolutla de contaminantes que son vertidos en los estuarios y pueden ser potencialmente bioacumulados por los organismos acuáticos (Arriaga *et al.*, 2009; Botello *et al.*, 2010).

De acuerdo a los parámetros morfométricos de los peces estudiados, estos se encontraron en una etapa de crecimiento juvenil-adulto (Wang *et al.*, 2011), además por tener un ciclo de vida corto (5 a 6 años) y hábitos alimenticios relacionados con el sistema bentónico (Wang, Surge y Walker, 2011; Wakida-Kusunoki y Amador del Ángel, 2017); estos peces son buenos indicadores para diagnósticos de salud relacionados con la contaminación acuática (Botello *et al.*, 2010).

Por otra parte, el número de eritrocitos por mililitro encontrado en los peces analizados fue de 1.9×10^6 , sugiere que estos presentan una concentración baja

dentro de los parámetros hematológicos reportados en otras especies de bagres como lo indica Breazile (1982) y Montes de Oca (2015) en la especie *Ictalurus punctatus*.

Aunque el recuento de eritrocitos de los bagres *Ariopsis felis* señala una baja concentración a comparación de otras especies, esto no sugiere un compromiso en la salud de los organismos, pero sí está relacionado con la presencia de contaminación en los cuerpos acuáticos de Tecolutla, Veracruz (Arriaga *et al.*, 2009; Maceda-Veiga *et al.*, 2015; Witeska *et al.*, 2011).

Los eritrocitos en los peces bagre presentaron una forma ovoide y un núcleo semi-condensado al igual que otros estudios en peces. Vergara y Aldana, (1996); así como Conroy, (1972) menciona que esta forma es eficaz en el transporte de oxígeno debido a su mayor superficie de contacto. La descondensación de cromatina indica que ésta se encuentra en un estado metabólico activo, es decir se están transcribiendo los genes que codificarán para las proteínas útiles para que los eritrocitos realicen su función biológica. La Por otra parte, (Valdebenito *et al.*, 2011) reporta eritrocitos con forma elíptica y de menor tamaño en el pez puye (*Galaxus maculatus*) sugiriendo que los peces con mayor actividad natatoria requieren mayor concentración de eritrocitos con forma elíptica para el transporte de oxígeno a los órganos mientras que los peces con eritrocitos con forma ovalada tienden a tener comportamientos bentónicos por lo que el eritrocito adopta esta forma para tener mayor superficie de contacto en comparación con la forma elíptica.

El tamaño de los linfocitos y monocitos de los peces bagres *A. felis* analizados es similar a los reportados por diversos autores (Vergara y Aldana, 1996; Barrios, 2011;

Minaya Ibáñez, 2018) señalando que la variación del tamaño en linfocitos de peces se debe a su estado de madurez, sugiriendo que los pequeños constituyen células en desarrollo que deben incrementar su tamaño para cumplir sus funciones y los grandes son linfocitos productores de anticuerpos (Vergara y Aldana, 1996; Minaya Ibáñez, 2018).

Las alteraciones observadas en los eritrocitos como poiquilocitosis, equinocitosis y eritrocitos hipocrómicos pueden ser reversibles con un factor 2, lo que representa un bajo impacto (Bernet *et al.*, 1999) dentro de la serie roja y no ponen en riesgo la salud de los peces bagres analizados. Por otra parte, la alta diseminación de células blásticas representan una alteración irreversible cuando hay daño en órganos hematopoyéticos o principios de anemia (Yilmaz y Mutaf, 2015), sin embargo, en los bagres de Tecolutla, esta alteración presentó poca diseminación por lo que se infiere que la presencia de estas células no afectan la serie roja de los organismos.

De acuerdo a la variación en la morfología nuclear de los eritrocitos, estos presentaron un valor de 3 en su importancia patológica lo que indica que, si esta alteración se encuentra diseminada en el torrente sanguíneo del bagre, puede volverse una lesión de alto impacto que eventualmente puede afectar la salud de los peces analizados (Witeska y Szczygielska, 2011).

Al observar la variación en la morfología nuclear de los eritrocitos a partir del análisis histopatológico, se realizó una evaluación genotóxica a través de un ensayo cometa para determinar el daño en el material genético. Los bagres de Tecolutla presentaron niveles moderados de daño en el material genético. Los trabajos de Guevara *et al.*, (2014); así como de Arriaga *et al.*, (2009) mencionan que en

Tecolutla Veracruz existe la presencia de metales provenientes de actividades industriales y que son vertidos en el río de Tecolutla. Por tal razón, es probable que estas sustancias sean las causantes de alteraciones genómicas en los eritrocitos de los peces bagre (Martins y Costa, 2015; Olivares *et al.*, 2014; Witeska *et al.*, 2011). La ruptura en sitios lábiles del material genético en eritrocitos de peces, es sugerido como un biomarcador de efecto producido por exposición a contaminantes acuáticos, principalmente por exposición a metales y especies reactivas del oxígeno (EROS) (Olivares *et al.*, 2014). Por esta razón, el ensayo cometa resulta ser un método ampliamente recomendado para determinar el daño producido por agentes tóxicos en los cuerpos de agua, además de generar información sobre el estado de salud que pueden presentar los organismos acuáticos al estar en exposición a contaminantes del agua Singh *et al.*, (1988); Witeska, Kondera y Szczygielska, (2011).

En cuanto a la genotoxicidad de los eritrocitos, Brugés y Reguero (2007) y Olivares *et al.*, (2014) mencionan que las principales causas de daño en el material genético en peces se deben a la presencia de metales en los cuerpos de agua por lo que, cuando se observan alteraciones preliminares que modifiquen la estructura del material genético en eritrocitos de peces, resulta de gran importancia realizar estos estudios con el fin de establecer criterios de evaluación genotóxicos e histopatológicos.

El diagnóstico de salud de los peces obtenido a través de los indicadores: importancia patológica e intensidad de reacción de las alteraciones en los eritrocitos, mostró que los bagres de Tecolutla presentan alteraciones que eventualmente

pueden afectar su estado de salud, sin embargo, según nuestros resultados, el sistema acuático en el que se desarrollan aún no presentan niveles altos de contaminación. Bernet *et al.*, (1999) y Zimmerli *et al.*, (2007) mencionan que el análisis histopatológico a partir de estos criterios de evaluación (Importancia patológica) resultan de gran importancia para determinar la relación de alteraciones con la contaminación acuática, además añadir a los estudios tisulares análisis semicuantitativos ayudan a generar diagnósticos de salud confiables.

Los estudios hematológicos, como los elaborados en este trabajo, resultan ser de gran utilidad para el monitoreo de la contaminación debido a su bajo costo, obtención de muestras biológicas y obtención de resultados en un corto tiempo. Por esta razón, se recomiendan como un primer paso para generar diagnósticos de salud preliminares. Estos acercamientos permiten evaluar la importancia patológica de las alteraciones que presentan los organismos acuáticos, así como su relación con la contaminación acuática y con base a los resultados obtenidos, sirven de indicadores para que posteriormente se realicen pruebas específicas. De acuerdo a Rodak y Carr (2014) y Castelletto, (2013), es importante establecer protocolos hematológicos estandarizados para realizar diagnósticos de salud más confiables y que coadyuven a los programas de monitoreo de la contaminación en los cuerpos acuáticos.

Conclusiones

- Los parámetros morfométricos y biológicos de los peces bagre *Ariopsis felis*, así como los fisicoquímicos del agua señalan que estos organismos presentan un crecimiento y desarrollo óptimo del sistema en el que habitan.
- La concentración de eritrocitos se considera un biomarcador hematológico integral para establecer un diagnóstico de salud en peces, por lo que se sugiere reportar este parámetro en los estudios relacionados con la contaminación acuática.
- El Factor de importancia (FI) así como la Intensidad de reacción (IR) se consideran criterios de evaluación que pueden ser aplicados en alteraciones tisulares del torrente sanguíneo de peces como se demostró en este estudio.
- Las alteraciones observadas en los organismos analizados fueron: poiquilocitosis, equinocitosis, eritrocitos hipocrómicos, células blásticas y variación en la morfología nuclear, siendo esta última la de mayor importancia patológica e intensidad de reacción de los bagres analizados.
- El material genético evidenció daño en los eritrocitos de los bagres *A. felis* por lo cual se recomienda el uso del ensayo cometa como prueba complementaria para determinar daño genotóxico en organismos silvestres.
- Los índices de reacción permitieron estimar el grado de daño en los eritrocitos de los peces bagre *Ariopsis felis* de Tecolutla, Veracruz por lo que se

recomienda utilizar éstos índices en la evaluación de la contaminación acuática.

- El índice de salud, indicó que las alteraciones observadas no representan un riesgo para los organismos. Sin embargo, las alteraciones pueden progresar si el estrés ambiental se incrementa causando lesiones más severas que comprometan la condición fisiológica.
- El presente estudio demuestra que el recuento de eritrocitos, así como los índices histopatológicos y la frecuencia de daño genotóxico resultan ser biomarcadores importantes para la evaluación de la contaminación acuática.
- Se recomienda complementar los estudios sanguíneos con análisis en otros órganos para establecer un diagnóstico de salud más robusto en los peces bagre *Ariopsis felis* así como su importancia dentro de los programas de monitoreo ambiental.

Bibliografía

- Ansoar, Y., Fontanetti, C., Christofolletti, C., & Díaz, C. (2015). Aplicaciones del ensayo cometa en genética ecotoxicológica. *CENIC Ciencias Biológicas*, 46(1), 51–62.
- Arriaga, M., Hernández, L., Sandoval, F., Vera, J., Vargas, E., & García, L. (2009). Monitoreo de la calidad del agua del Río Tecolutla desde Coyutla hasta Gutierrez Zamora, Veracruz. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 5(2), 141–147.
- Barrios, R. C. (2011). Características morfométricas de las células sanguíneas de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) alimentadas con suplemento de ensilaje de vísceras de pescado durante la etapa de ceba. *Citecsa*, 2(2), 68–74.
Recuperado de:
<http://www.unipaz.edu.co/ojs/index.php/revcitecsa/article/view/14>
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt, P., & Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, (June 1999), 25–34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>
- Botello, A., Fragoso, S., Gutiérrez, J., & Rojas, J. L. (2010). *Vulnerabilidad de las zonas costeras mexicanas ante el cambio climatico. Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Bratosin, D., Dobre, A., Rugina, A., Calu, L., & Tuşa, I. (2016). Flow cytometry of nucleated red blood cells used as monitoring technique for aquatic risk assessment. A. Recuperado de :https://www.researchgate.net/profile/Daniela_Bratosin/publication/310257782_2016_BRATOSIN_Flow_cytometry_of_nucleated_red_blood_cells_used_as_monitoring_technique_for_aquatic_risk_assessment_A_review/links/582ad8d308ae004f74af12aa.

Brugés, K., & Reguero Reza, M. T. (2007). Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. *Revista Colombiana de Biotecnología*, IX(Nº1), 5–13. Recuperado de: www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/702

Castelletto, E. (2013). Recomendaciones para la interpretación del frotis sanguíneo del subprograma de morfología sanguínea. (p. 39). Departamento Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

Guevara Carrió, E. del C. Amador del Ángel, L. E., González Elías, J. M., Brito, Y., Pérez, R., & Huerta, E. (2014). Análisis de los parámetros físico-Químicos y algunos aspectos biológicos en el Sistema Fluvio Lagunar Deltaico Río Palizada , en el Área de Protección de Flora y Fauna Laguna de Tér ..., (October).

Guzmán-García, X., Martínez-López, A., Rodríguez-Medina, L., González-Márquez, H., & Vázquez-Botello, A. (2007). Cambios tisulares en el ostión *Crassostrea virginica* por exposición y depuración al cadmio. *Hidrobiologica*, 17(1 SUPPL.), 41–48.

- Jeronimo, J. J. R. (2013). “ Biomarcadores de salud y calidad aplicados a la almeja *Polymesoda caroliniana* (Bosc , 1801) (Bivalva : Corbiculidae) de Tecolutla , Veracruz ” ., 1–99.
- Maceda-Veiga, A., Figuerola, J., Martínez-Silvestre, A., Viscor, G., Ferrari, N., & Pacheco, M. (2015). Inside the Redbox: Applications of haematology in wildlife monitoring and ecosystem health assessment. *Science of the Total Environment*, 514, 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.004>
- Martins, M., & Costa, P. M. (2015). The comet assay in Environmental Risk Assessment of marine pollutants: Applications, assets and handicaps of surveying genotoxicity in non-model organisms. *Mutagenesis*, 30(1), 89–106. <https://doi.org/10.1093/mutage/geu037>
- Minaya Ibáñez, A. P. (2018). Evaluación del perfil hematológico y bioquímico en Gamitana (*Colossoma macroponum*) de la amazonia peruana. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Perú.
- Olivares, H. G., Muñoz, R. G., Vásquez, D. C., Valladares, M. M., & Valenzuela, G. L. (2014). Assessment of genotoxicity of coastal waters of central Chile on fishes *Mugil cephalus* and *Odontesthes brevianalis* | Evaluación de la genotoxicidad de las aguas costeras de Chile central sobre los peces *Mugil cephalus* y *Odontesthes brevianalis*. *Hidrobiologica*, 24(3), 271–279.
- Olivares, H. G., Muñoz, R. G., Vásquez, D. C., Valladares, M. M., & Valenzuela, G. L. (2014). Evaluación de la genotoxicidad de las aguas costeras de Chile central sobre los peces *Mugil cephalus* y *Odontesthes brevianalis*. *Hidrobiologica*,

24(3), 271–279.

Padrós, F. (2005). Manual de Técnicas básicas de diagnóstico patológico en peces. 1–62.

Rodak, B. F. y Carr, J. H. (2015). Atlas de Hematología Clínica. 4ta Edición. Médica Panamericana.

Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice & E. L. Schneider. (1988). A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175: 184-191.

Valdebenito, I., Busse, K., Jaramillo, N., & Hernández, A. (2011). Blood cytology of the common jollytail (*Galaxias maculatus*) (Jenyns, 1842) (Osmeriformes: Galaxiidae) at postlarval and adult stages. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 43(3), 233–239. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2011000300005>

Vazzana, M., Salerno, G., Celi, M., Vizzini, A., Parrinello, D., Luigia, M., Nn, F. F. (2009). Effect of in vitro exposure to cadmium and copper on sea bass blood cells, 2(Cd), 884–886.

Vergara Pinzón, E. V., & Mantilla Aldana, L. (1996). Morfología comparativa de las células sanguíneas del tiburón nodriza *Ginglymostoma cirratum* con diversos peces. *Dahlia*, 1, 97–102.

Wakida-Kusunoki, A. T., & Amador del Ángel, L. E. (2017). Vertebral deformities in hardhead catfish *Ariopsis felis* (Siluriformes: Ariidae) in the southeastern Mexico. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52(1), 159–162. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572017000100013>

- Wang, T., Surge, D., & Walker, K. J. (2011). Isotopic evidence for climate change during the vandal minimum from *ariopsis felis* otoliths and *mercenaria campechiensis* shells, Southwest Florida, USA. *Holocene*, 21(7), 1081–1091. <https://doi.org/10.1177/0959683611400458>
- Witeska, M., Kondera, E., & Szczygielska, K. (2011). The Effects of Cadmium on Common Carp Erythrocyte Morphology, 20(3), 783–788.
- Yilmaz, M., & Mutaf, B. F. (2015). Comparative Morphometry of Erythrocytes of Different Fish Species, 1–4.
- Zeitz, M., & Sens, P. (2012). Reversibility of red blood cell deformation. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 85(5), 1–9. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.85.051904>
- Zimmerli, S., Bernet, D., Burkhardt-Holm, P., Schmidt-Posthaus, H., Vonlanthen, P., Wahli, T., & Segner, H. (2007). Assessment of fish health status in four Swiss rivers showing a decline of brown trout catches. *Aquatic Sciences*, 69(1), 11–25. <https://doi.org/10.1007/s00027-006-0844-3>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00179

Matrícula: 2163001976

ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES EN CÉLULAS SANGUÍNEAS DEL PEZ BAGRE (*Ariopsis felis*) DE TECOLOTLA, VERACRUZ PARA ESTABLECER UN DIAGNÓSTICO DE SALUD.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 13 del mes de diciembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. EDITH CORTES BARBERENA
- DR. LEOBARDO MANUEL GOMEZ OLIVAN
- DR. JUAN CARLOS SEGOVIANO RAMIREZ
- DRA. MARCELA GALAR MARTINEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA

DE: MISAEAL HERNANDEZ DIAZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

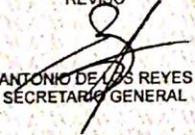
Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



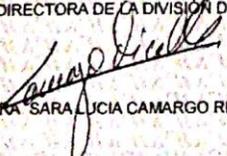
MISAEAL HERNANDEZ DIAZ
ALUMNO

REVISÓ



DR. JOSE ANTONIO DE LOS REYES HEREDIA
SECRETARIO GENERAL

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



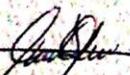
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA



DRA. EDITH CORTES BARBERENA

VOCAL



DR. LEOBARDO MANUEL GOMEZ OLIVAN

VOCAL



DR. JUAN CARLOS SEGOVIANO RAMIREZ

SECRETARIA



DRA. MARCELA GALAR MARTINEZ