



UNIVERSIDAD  
SAN SEBASTIAN

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA NATURALEZA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA  
CARRERA MEDICINA VETERINARIA  
SEDE CONCEPCIÓN**

**EVALUACIÓN DE MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS DE SANGRE  
PERIFÉRICA SOBRE *Carassius auratus* COMO BIOMARCADOR  
DE GENOTOXICIDAD**

Memoria para optar al título de Médico Veterinario

Profesor Tutor: Mg Marcelo Alejandro Raby Cifuentes MV  
**Estudiante: Valentina Andrea Almeyda Moya**

## HOJA DE CALIFICACIÓN

En Concepción, el día 02 de Diciembre de 2024, los abajo firmantes dejan constancia que el (la) estudiante Valentina Andrea Almeyda Moya de la carrera de MEDICINA VETERINARIA ha aprobado la tesis para optar al título de MÉDICO VETERINARIO con una nota de 5,5



Dra. AnaLía Henríquez Herrera. MV.

Profesor Evaluador



Mg. Nelson Andrés Sandoval Cancino. MV.

Profesor Evaluador



MARCELO RABY CIFUENTES  
Médico Veterinario  
RUF-15.148.75-2

Mg. Marcelo Alejandro Raby Cifuentes MV.

Profesor Evaluador y Tutor

## TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
ÍNDICE DE TABLAS .....	v
RESUMEN .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. HIPÓTESIS .....	6
3. OBJETIVOS .....	7
4. MATERIALES Y MÉTODO .....	8
5. RESULTADOS .....	14
6. DISCUSIÓN .....	19
7. CONCLUSIONES .....	21
8. REFERENCIAS .....	22
9. ANEXOS .....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mapa del sitio de recolección de las muestras de agua en el sureste de Chile, región del Biobío.....	<b>8</b>
<b>Figura 2:</b> Formación de micronúcleos y anomalías en células de <i>Carassius auratus</i> , magnificación 1000x.....	<b>36</b>
<b>Figura 3:</b> Brotes nucleares en eritrocitos de sangre periférica de <i>Carassius auratus</i> , magnificación 1000x.....	<b>36</b>
<b>Figura 4:</b> Puentes nucleares en eritrocitos de sangre periférica de <i>Carassius auratus</i> , magnificación 1000x.....	<b>36</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> .....	14
<b>Tabla 2:</b> .....	14
<b>Tabla 3:</b> .....	15
<b>Tabla 4:</b> .....	16
<b>Tabla 5:</b> .....	16
<b>Tabla 6:</b> .....	16
<b>Tabla 7:</b> .....	17
<b>Tabla 8:</b> .....	17
<b>Tabla 9:</b> .....	17
<b>Tabla 10:</b> .....	18
<b>Tabla 11:</b> .....	18

## RESUMEN

Los micronúcleos corresponden a uno de los marcadores de biogenotoxicidad más estudiados los que forman a partir de la exposición a agentes tóxicos presentes en el ambiente que poseen afinidad por el material genético. Estos actúan sobre las proteínas involucradas en el proceso de división celular como así también en el mismo material genético, causando en ambas instancias daño directo y fomentando la inestabilidad genómica, siendo una de las consecuencias detectables de este fenómeno, es la generación de material genético independiente al núcleo de la célula bajo una estructura que se ha denominado micronúcleo detectable en el citoplasma de la célula afectada. Estos tóxicos ambientales suelen derivar de actividades antropogénicas que contaminan diversos ecosistemas, tanto terrestres como acuáticos. Por lo tanto, el análisis de calidad de agua se ha convertido en una importante herramienta para estimar genotoxicidad, la que puede ser evaluada mediante el conteo de micronúcleos, considerando, en este contexto, que la fauna acuática está en constante y estrecho contacto con agentes genotóxicos. El presente estudio de carácter experimental transversal tiene como intención evaluar la presencia de micronúcleos en eritrocitos periféricos de *Carassius auratus* como biomarcador para la estimación de la genotoxicidad, para esto se sometieron 30 especímenes divididos en grupo control y experimental de *Carassius auratus* en condiciones de laboratorio a aguas contaminadas con efluentes de plantas de celulosa en el río Biobío, ubicado en la zona sur de Chile. El período de experimentación tuvo una duración de 15 días en los cuales se establecieron intervalos puntuales para la medición de los parámetros fisicoquímicos de las aguas y extracción de sangre periférica de los individuos sometidos al experimento. Luego de evaluar la cantidad de micronúcleos no se lograron establecer diferencias significativas entre grupo control y grupo experimental a la formación de micronúcleos, tampoco se encontraron células con una cantidad mayor a 1 micronúcleo en el citoplasma. Se encontraron anomalías nucleares por lo que, aunque no fue posible estimar la genotoxicidad de las aguas del río Biobío, tampoco fue posible descartarla, en consecuencia, se sugiere complementar el test de micronúcleos con otros estudios con el fin de obtener resultados más precisos en la estimación de genotoxicidad. Futuras evaluaciones sobre la sensibilidad de diferentes especies acuáticas frente a distintos parámetros para medir genotóxicos nos ayudarán a tener más claridad respecto a la magnitud y el impacto de la contaminación en estos ecosistemas.

Palabras clave: Genotoxicidad, biomarcador, micronúcleos, peces, agua.

## ABSTRACT

Micronuclei correspond to one of the most studied biogenotoxicity markers, forming as a result of exposure to toxic agents present in the environment that have an affinity for genetic material. These agents act on the proteins involved in the cell division process as well as on the genetic material itself, causing direct damage in both instances and promoting genomic instability. One of the detectable consequences of this phenomenon is the generation of genetic material independent of the cell nucleus, under a structure called a micronucleus, which is detectable in the cytoplasm of the affected cell. These environmental toxins often derive from anthropogenic activities that contaminate various ecosystems, both terrestrial and aquatic. Therefore, water quality analysis has become an important tool for estimating genotoxicity, which can be evaluated by counting micronuclei, considering that aquatic fauna are in constant and close contact with genotoxic agents. This cross-sectional experimental study aims to evaluate the presence of micronuclei in the peripheral erythrocytes of *Carassius auratus* as a biomarker for estimating genotoxicity. To this end, 30 specimens were divided into control and experimental groups of *Carassius auratus* under laboratory conditions and exposed to water contaminated with effluents from pulp mills in the Biobío River, located in the southern zone of Chile. The experimental period lasted 15 days, during which specific intervals were established for measuring the physicochemical parameters of the waters and extracting peripheral blood from the individuals subjected to the experiment. After evaluating the number of micronuclei, no significant differences could be established between the control group and the experimental group in micronucleus formation. Additionally, no cells were found with more than one micronucleus in the cytoplasm. Nuclear abnormalities were found; thus, although it was not possible to estimate the genotoxicity of the Biobío river waters, it was also not possible to rule it out. Consequently, it is suggested to complement the micronucleus test with other studies to obtain more precise results in estimating genotoxicity. Future evaluations on the sensitivity of different aquatic species to various parameters for measuring genotoxins will help us better understand the magnitude and impact of contamination in these ecosystems.

Keywords: Genotoxicity, biomarker, micronuclei, fish, water.

# 1. INTRODUCCIÓN

El análisis de calidad de agua mediante el uso de especímenes acuáticos como bioindicadores ofrece respuestas precisas respecto al estrés ambiental, al igual que ofrece una señal de alerta ante posibles desbalances medioambientales (Viana et al., 2022). La creciente demanda y excesiva explotación de los recursos naturales afecta a estos en una escala tanto global como local (Maurya y Malik, 2019).

## 1.1 Aplicación de bioindicadores en la monitorización ambiental

El término “bioindicador”, también conocido como “biomarcador”, fue definido por el Commute on Biological Markers of the National Research Council (NCR) como “señales indicadoras en sistemas biológicos o muestras expuestas a químicos” (Schlenk, 1999). Estos biomarcadores proveen información valiosa en diversos campos de estudio y son usados para medir distintos parámetros relacionados con respuestas fisiológicas tempranas a niveles tisulares, celulares y bioquímicos frente a la exposición a compuestos químicos (Quiroz-Jara et al., 2021).

## 1.2 Contaminación en cuerpos de agua

Ríos, estanques, lagos y mares están contaminados con una variedad de desechos sólidos y líquidos (Walia et al., 2015). Muchas veces, estos contaminantes corresponden a químicos inorgánicos que son considerados tóxicos para la biota acuática, los cuales proceden de la actividad antropogénica que amenaza la bioestabilidad de los ecosistemas (dos Santos et al., 2020). Estos compuestos podrían bioacumularse causando serios problemas para organismos acuáticos que los incorporan a través tramas tróficas como para los humanos que los consumen, constituyendo una amenaza para la salud (Ardeshir et al., 2017; Viana et al., 2022; Walia et al., 2015).

Actividades como la minería, manufactura, uso de fertilizantes y pesticidas forman parte de las cinco principales fuentes de contaminación en los distintos continentes (Zhou et al., 2020). La presencia de estos químicos en contacto directo con peces podría tener

una acción genotóxica, ya que tienen afinidad por unirse al material genético, causándole daño (dos Santos et al., 2020). Es importante destacar que esta acción genotóxica es detectable inclusive en concentraciones subletales (Gutiérrez et al., 2014).

Estos componentes genotóxicos al estar presentes en el agua son capaces de causar numerosos cambios y desbalances ambientales que promueven la reducción de la fauna nativa e incluso llevar al colapso de estos ecosistemas en el cual dicho deterioro contribuiría aún más a la disminución en la calidad del agua en los ecosistemas (Viana et al., 2021; Guerra et al., 2020).

### 1.3 Formación de micronúcleos

Los genotóxicos actúan sobre las proteínas involucradas en el proceso de división celular causándole daño a estas mismas, lo que se logra gracias a una variedad de mecanismos descritos los cuales causan la pérdida de la integridad genómica, al igual que formación de micronúcleos (MN) y anormalidades nucleares (Canedo et al., 2021; Fenech et al., 2020).

Los MN fueron inicialmente conocidos como cuerpos de Howell-Jolly, los cuales fueron primeramente descritos en reticulocitos humanos por los hematólogos William Howell en 1980 y Justin Jolly en 1905 (Guo et al., 2019). Estos micronúcleos son pequeños compartimientos ubicados en la región perinuclear los cuales contienen ADN encapsulado por un sobre nuclear, que se encuentra separado espacialmente del núcleo primario (Krupina et al., 2021). La formación de estos MN inicia a partir de la condensación de fragmentos cromosómicos inclusive el mismo cromosoma entero, que no se encuentra participando en la etapa de anafase mitótica a causa de disfunciones o rompimiento del huso, en consecuencia, este fragmento o cromosoma completo después de la telofase aparece como un núcleo secundario el cual es más pequeño que el núcleo principal y es llamado “micronúcleo” (Walia et al., 2015).

El test de MN, utilizado principalmente para la monitorización de daño genotóxico, se ha convertido en uno de los métodos más usados para la detección y evaluación de efectos mutagénicos causados por agentes químicos, ya que corresponde a uno de los test más factibles, confiables y mejor establecidos (Sommer et al., 2020; Walia et al., 2015;

Schmid, 1975), el cual tiene la habilidad de identificar la genotoxicidad de un amplio rango de componentes tóxicos, detectando tanto efectos augénicos como clastogénicos (Hussain et al., 2018), siendo apropiado para evaluar daño en el ADN inclusive a niveles bajos de contaminación (Abdel-Khalek et al., 2020 citado de Gadhia et al., 2016).

#### 1.4 Evaluación de genotoxicidad acuática con micronúcleos

Aunque el test de MN fue originalmente desarrollado para su aplicación en ratas, fue subsecuentemente modificado para su aplicación en peces por los autores Hooftma y De Raat en el año 1982 (Ayllon y García-Vazqu ez, 2000).

El test de MN en peces est a basado en analizar la frecuencia de pequeños n ucleos anormales en eritrocitos (que poseen n ucleo, a diferencia de los mamíferos) (Guo et al., 2019 citado de Fenech et al., 2019). No existe una metodología específica para testear MN y anormalidades nucleares en peces, pese a su amplia utilización como una forma de determinar y evaluar efectos mutagénicos inducidos por contaminantes en condiciones de campo y laboratorio (Canedo et al., 2021).

Los miembros de la familia Cyprinidae, son modelos animales implementados para estudios de genotoxicidad y potencial genotóxico, debido a que estos especímenes permanecen en constante contacto con el agua, son de fácil disponibilidad y poseen una remarcable capacidad para soportar estrés, facilitando una vía temprana de advertencia ante tóxicos, con la capacidad de inducir alteraciones y provocar degradaciones ambientales (Walia et al., 2015; Hussain et al., 2018). Estas especies centinelas se usan como indicadores debido a sus respuestas moduladas e integradas a xenobióticos ambientales (Gutiérrez et al., 2015).

El uso de peces enjaulados ha sido ampliamente utilizado en programas de biomonitorización para evaluar efectos contaminantes en biotas acuáticas y como referencia a comparación con peces silvestres para estimar genotoxicidad (Silva et al., 2021; Hussain et al., 2018). Parte de estos estudios han sido efectuados en especímenes de *Carassius auratus* y en otros miembros de la familia Cyprinidae para la evaluación de MN, ya sea en ambientes naturales como artificiales, donde se señala que el uso de exposición enjaulada y en acuarios corresponde a una estrategia adecuada para

monitorear agentes genotóxicos en ecosistemas de agua dulce (Klobucar et al., 2010). Dentro de los agentes genotóxicos testeados en estos especímenes se encuentran metales pesados como el Arsénico (Kumar et al., 2013), herbicidas (Cavas y Könen Adigüzel, 2007; Cavas, 2011), Componentes disruptores endocrinos (EDCs) (Viganò et al., 2015), Acrilamida (Tan et al., 2013), fármacos como el Diclofenaco, Ibuprofeno, Amoxicilina, (Islas-Flores et al., 2017; OrozcoHernández et al., 2019) e inclusive factores estresantes como golpes de calor (Anitha et al., 2000) y efectos adversos de efluentes de aguas residuales en agua dulce (Samanta et al., 2018).

#### 1.4.1 Variabilidad del test de micronúcleos

Si bien se observan respuestas positivas ante gran variedad de componentes genotóxicos, una de las desventajas del test de micronúcleos en peces es su variabilidad interespecie (Rodríguez-Cea et al., 2003), descrito desde 0 a 13 MN cada 1000 células. Esta variabilidad también puede ser atribuible a otros factores bióticos como el sexo del individuo, condiciones de tratamiento (Bolognesi y Hayashi, 2011) y edad, se señala que en ciertas especies el uso de especímenes más jóvenes (alrededor de 1 año) proporciona resultados que reflejan una mayor tasa de división celular en comparación sobre individuos de mayor edad (Linde et al., 1998).

#### 1.5 Importancia del test de micronúcleos en Chile

Chile no escapa de la presencia de contaminantes ambientales (Alonso et al., 2017), especialmente en la ecorregión mediterránea del país, la cuál es crucial para la conservación de la fauna acuática nativa del territorio, debido a que prácticamente la mitad (21 de 46) de las especies acuáticas autóctonas de Chile habitan en esta región, siendo 17 de estas endémicas (Vila y Habit, 2014).

Actualmente 47 Plantas de tratamiento de aguas residuales operan en la región del Biobío y 23 de ellas depositan sus efluentes en áreas circundantes al río, mientras 4 descargan directamente sus efluentes al cuerpo de agua (Barra et al., 2021).

La presencia de tóxicos de diversa composición química, incluyendo componentes clasificados como EDCs, han sido detectados en la cuenca del río Biobío, presentes en tanto en efluentes, agua y sedimento (Alonso et al., 2017; Alonso et al., 2017 citado de Saavedra Mondaca, 2015). Se sospecha que algunos de estos EDCs provienen de las plantas de celulosa localizadas en la parte central de la cuenca del río Biobío (Barra et al., 2021). Se ha confirmado que estos componentes tienen una gran cantidad de efectos nocivos en la salud, incluyendo genotoxicidad (Li et al., 2023; Haq et al., 2017; Balabanič et al., 2017), los cuales podrían afectar organismos acuáticos e incluso entrar a la cadena alimentaria de los humanos a través del agua o comida y afectar negativamente a la población (Gore et al., 2015; Balabanič et al., 2017).

En comparación con otras regiones del mundo notablemente estudiadas, en Chile escasea la literatura científica en relación con ecosistemas acuáticos, especialmente en la región mediterránea (Fierro et al., 2019; Tierno de Figueroa et al., 2013).

#### 1.6 Justificación y planteamiento del problema

Aunque se ha efectuado un importante esfuerzo para monitorear el agua de la cuenca del río Biobío, aún existe una considerable falta de conocimiento respecto a la calidad de esta (Alonso et al., 2017). La vulnerabilidad de la fauna acuática es evidente, siendo los peces el grupo taxonómico más afectado (Fierro et al., 2019), por lo que destaca la importancia de efectuar estudios no letales que involucren la toma de muestras tales como sangre, orina y tejidos para biopsias, que puedan ser usadas para monitorear especímenes sin la necesidad de sacrificarlos, lográndose preservar la biodiversidad de la región (Bahamonde et al., 2019).

Por lo tanto, el presente estudio tiene como finalidad evaluar la presencia de micronúcleos en eritrocitos periféricos de *Carassius auratus* como biomarcador para la estimación de la genotoxicidad.

## 2. HIPÓTESIS

Hipótesis Nula (H0)

No existe variación en la cantidad de micronúcleos de los individuos de *Carassius auratus* respecto a la cantidad base.

Hipótesis Alternativa (H1)

Existe variación en la cantidad de micronúcleos de los individuos de *Carassius auratus* respecto a la cantidad base.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1.- Objetivo general

Evaluar la presencia de micronúcleos en eritrocitos periféricos de *Carassius auratus* como biomarcador para la estimación de la genotoxicidad.

#### 3.2.- Objetivos específicos

1.- Determinar la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos periféricos de *Carassius auratus* durante la exposición a las aguas del río Biobío.

2.- Analizar la relación entre la duración de la exposición a las aguas del río Biobío y la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos periféricos de *Carassius auratus*.

## 4. MATERIALES Y MÉTODO

### Área de estudio

Se tomaron muestras de agua proveniente del río Biobío en la localidad de Negrete (-37.582366°N, -72.539493°W), de una descarga de celulosa (Planta de celulosa). La zona de donde proviene el agua corresponde a la parte media del río Biobío, siendo una zona de tipo transición entre los ambientes arribales y potamales, que se caracteriza por tener un fondo una mezcla de finos con gravas y bolones (Allan et al.,2007).

El clima de la región es mediterráneo de lluvia invernal.

Denominación Koppen Csb: Mediterráneo de veranos frescos. Inviernos fríos o templados y veranos secos y frescos. La mayor parte de las lluvias caen en invierno o en las estaciones intermedias con una vegetación natural correspondiente a bosque mediterráneo (Koppen, 1948).



**Figura 1.** Mapa del sitio de recolección de las muestras de agua, región del Biobío, Chile central. (Extraído de Google Earth Pro)

Se tomó en consideración que se encontraron 16 contaminantes emergentes de variados grupos químicos en la cuenca del río Biobío, tales como organoclorados, fenoles, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), bencenos alquil lineales, bifenilos

policlorados, esteroides, compuestos farmacéuticos y de cuidado personal. En el caso de compuestos inorgánicos, varios metales y sustancias inorgánicas de nitrógeno han sido identificados en la cuenca (Alonso et al., 2017).

### **Extracción y almacenamiento del agua**

El agua se extrajo de acuarios tapados para evitar la volatilización de componentes, y se transportó al lugar de experimentación, donde se vertió en un total de 4 acuarios, divididos en dos grupos, el grupo experimental y un grupo control. Además, una cantidad adicional se reservó en acuarios cubiertos con tapas de vidrio para los subsecuentes cambios de agua (1/4 de cambio cada dos días).

Los peces habían sido previamente expuestos, en la totalidad de su ciclo de vida exclusivamente a agua de llave posteriormente declorada, con origen en la ciudad de Talcahuano, región del Biobío, Chile.

### **Toma y almacenamiento de muestras**

Se tomaron muestras de sangre al grupo de individuos control y experimental, al inicio del experimento, previo a ser sometidos a la exposición del agua y post exposición, concretamente a las 6 horas y a los días 3, 7 y 15 del experimento.

Todos los grupos fueron puncionados utilizando agujas 27G x 1 1/2, se extrajo a los peces de los respectivos acuarios con redes, la aproximación lateral a los vasos vertebrales caudales se efectuó insertando la aguja unos pocos milímetros por debajo de la línea lateral, cerca de la base del pedúnculo caudal. La aguja es dirigida entonces hacia la línea media, bajo los cuerpos vertebrales para luego aspirar la sangre (entre 0,1- 0,3 ml). Esto mientras el pez se encuentra sujeto por el operador con guantes de nitrilo y posicionado sobre un balde recubierto por una red, evitando la caída del animal en caso de que el pez cayese.

La sangre se vertió en tubos de tapón lila (EDTA), la cual se trasladó en contenedores protegidos de la luz solar, bajo una temperatura de 4°C, con destino hacia el laboratorio

de diagnóstico veterinario de la Universidad San Sebastián, donde se procedió al análisis de la muestra.

El protocolo de fijación de las muestras utilizado se encuentra descrito en el anexo II.

### **Tamaño muestral**

Se utilizó un tamaño muestral correspondiente a 30 individuos de *Carassius auratus*, obtenidos del criadero “Animals World”, ubicado en la comuna de Talcahuano, región del Biobío.

La cantidad de individuos se eligió por conveniencia, debido a la disposición de los materiales y el espacio requerido para mantenerlos en óptimo estado fisiológico.

Debido al tamaño de los peces ( $10 \pm 5$  cm de longitud desde el punto más craneal de la zona cefálica hasta el fin de la aleta caudal). Para garantizar la confiabilidad del experimento se utilizaron acuarios con un volumen óptimo, con el objetivo de mantener la estabilidad de los parámetros fisicoquímicos de las aguas.

Se consideró un tamaño muestral similar para el total de individuos, de acuerdo con la metodología descrita por Polard et al., 2011, Oliveira et al., 2021 y Venturoti et al., 2019. La densidad poblacional se calculó en base a estudios previos con la utilización de *Carassius auratus*, de los autores Cavas en el año 2011 y Cantu et al., (2023), resultando en un total de 6,4 L por pez.

### **Diseño experimental**

El estudio consistió en un experimento con una duración de 15 días y fue llevado a cabo en verano (6 de febrero, 2024), con el fin de evaluar el posible daño genotóxico por contaminantes. Fueron utilizados 30 individuos divididos en dos grupos de 15 peces, cada grupo en un acuario con 80 litros.

Para la estandarización de los resultados ante variables que pudieran influir, como la volatilización de componentes en el agua y la contaminación causada por desechos metabólicos de los peces, se realizaron recambios de agua en intervalos de dos días y se mantuvieron los acuarios tapados.

La determinación de la densidad poblacional en los acuarios se ejecutó mediante el uso de una balanza, se situó un recipiente con agua, seguidamente se procedió a tarar este recipiente, para luego pasar a cada pez dentro de él.

A ambos grupos con periodos de luz-oscuridad correspondientes a 12h:12h, para mantener el ambiente oxigenado, se proporcionó a cada acuario un filtro de esponja 1000 L/hr junto con un biofiltro Dajana ® para estandarizar la colonia de bacterias presentes en ambos acuarios.

Los peces fueron alimentados con un alimento envasado, formulado para cumplir con los requerimientos nutricionales de la especie (Tetra ® “Goldfish color”), que contiene 45% de proteína bruta, suministrado una vez al día.

### **Justificación de la duración del experimento**

La duración del experimento fue establecida con base en estudios previos sobre el test de micronúcleos, en los cuales se sugiere un tiempo de al menos 4 a 6 días de exposición para inducir su formación (Udroiu, 2006; Polard et al., 2011).

### **Monitoreo de variables químicas y físicas**

Se efectuó el monitoreo considerando los siguientes parámetros: pH (Hanna ® pHmetro digital), sólidos totales disueltos, conductividad y O<sub>2</sub> disuelto (Hanna ® multiparámetro).

Los parámetros fueron examinados *in situ* y en los acuarios de exposición al inicio del experimento, preexposición a las aguas (hora 0), a las 6 horas y a los días 3, 7 y 15.

## **Tinción diferencial de micronúcleos**

El reconocimiento de estructuras correspondientes a micronúcleos consideró la aplicación de la técnica de Feulgen detallada en el anexo número 1.

## **Contabilización**

Se efectuó la contabilización de micronúcleos de cada individuo previo a efectuar el experimento, estableciendo el número de micronúcleos base

Se contabilizó un total de 2000 glóbulos rojos por frotis sanguíneo a 1000x de magnificación, donde se determinó la cantidad de eritrocitos que poseen estructuras compatibles con micronúcleos.

El conteo de glóbulos rojos con y sin micronúcleos se efectuó específicamente en la región en la cual las células están dispuestas en monocapa, evitando la superposición que pueda dificultar el reconocimiento de estas estructuras. Las células seleccionadas para el conteo de micronúcleos se identificaron mediante la presencia de un citoplasma intacto, sin alteraciones en el contorno celular o nuclear.

El cálculo de frecuencia de micronúcleos fue ejecutado como está descrito en el anexo III.

## **Identificación de micronúcleos**

El criterio para considerar una estructura como micronúcleo se apoyó en la pauta facilitada por el autor Schmid (1975), que señala a los micronúcleos como estructuras circulares, regulares, que no se aprecian ligadas a estructuras cromáticas. En el caso particular de los peces, los micronúcleos corresponden a cuerpos ovoides, los cuales frecuentemente presentan diámetros que varían con una proporcionalidad entre 1:5 a 1:40, en comparación del núcleo principal.

Es relevante mencionar que el tamaño y forma de estos micronúcleos, son distintos a los observados en especies mamíferas.

## **Análisis estadístico**

El software R studio (versión 2024.04.2+764), fue utilizado para conocer la distribución de los datos con una prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965). Posteriormente se realizó una prueba *post-hoc* de Wilcoxon (Wilcoxon, 1945), para determinar el nivel de significancia entre cada par de grupos. Las diferencias se consideraron significativas en función del valor de  $p < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

Se evaluaron un total de 100 extendidos sanguíneos *Carassius auratus*.

Para obtener frotis óptimos para la cuantificación de micronúcleos, se descartaron 20 muestras debido a las condiciones desfavorables que se describen a continuación:

- 1) Evitar el estrés excesivo en los individuos al someterlos a múltiples intentos de extracción sanguínea en situaciones en las que no se logró canular de manera exitosa al individuo más de dos veces.
- 2) Falta de muestra, al corresponder a cantidades muy bajas de sangre por individuo, obtener el contenido de muestra necesario es problemático, sea a causa de falta de técnica, o la demora al verter el contenido dentro de los tubos tapón lila, provocando la coagulación temprana de la sangre.

Tabla 1. Análisis Estadístico

Comparación grupo control v/s grupo experimental	Mann-Whitney U Test	Valor de P	Significancia
6 horas	45	0.5828	No significativa ( $p > 0.05$ )
7 días	45	1	No significativa ( $p > 0.05$ )
15 días	105	0.3506	No significativa ( $p > 0.05$ )
6 horas v/s 15 días	105	0.5774	No significativa ( $p > 0.05$ )

Tabla 2. Análisis Estadístico

Comparación grupo control Whitney U	Mann-Whitney U Test	Valor de P	Significancia v/s grupo control
6 horas v/s 15 días		0.3531	No significativa ( $p > 0.05$ )

Pese a la falta de generación de micronúcleo se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para cada grupo y siendo la cual indica que los datos no seguían una distribución normal ( $p < 0,05$ ). Dado lo anterior, se realizó una comparación a través de una prueba U de Mann-

Whitney entre el grupo control y experimental en diferentes tiempos y entre el T1 y T3 de cada grupo para evaluar si existía diferencia significativa entre ellos, sin embargo, no se detectó en ninguna de las comparaciones realizada ( $p > 0,05$ , Tabla 1-3).

### **Conteo de micronúcleos**

Se registró un total de 3 micronúcleos en el grupo control y 6 en el experimental (Tabla 4-5). No se observaron células con más de un micronúcleo en el citoplasma. Además, se identificó un incremento en la cantidad de células en proceso de mitosis en ambos grupos y anomalías nucleares, correlacionado con el tiempo de exposición.

Imágenes de los hallazgos en el anexo IV.

A continuación, las tablas 4 y 5 contienen los resultados obtenidos de la cuantificación de micronúcleos, junto con la cantidad de muestras pertenecientes a cada grupo y sus respectivos tiempos de evaluación.

Tabla 3. Conteo de micronúcleos pertenecientes del grupo control.

Grupo (Control)	Micronúcleos Totales	Cantidad de muestras
Preexposición (hora 0)	0	13
6 horas	1	10
7 días	2	11
15 días	0	14

Tabla 4. Conteo de micronúcleos pertenecientes del grupo experimental.

Grupo (Experimental)	Micronúcleos Totales	Cantidad de muestras
Preexposición (hora 0)	0	14
6 horas	2	13
7 días	3	11
15 días	1	14

### Resultados estadística descriptiva:

Tabla 5. Estadística descriptiva de los resultados estadísticos para los micronúcleos totales en el grupo control:

Variable	Valor
Media	0.75
Mediana	0.15
Desviación Estándar	0.96

Tabla 6. Estadística descriptiva de los resultados estadísticos para los micronúcleos totales en el grupo experimental:

Variable	Valor
Media	1.5
Mediana	1.5
Desviación Estándar	1.29

Estos resultados sugieren que el tratamiento aplicado en el grupo experimental tiene un efecto significativo en la frecuencia de micronúcleos, aumentando tanto la media como la dispersión de los conteos en comparación con el grupo control.

A continuación, se presentan las variables fisicoquímicas del agua, analizadas, ordenadas por grupo y acuario correspondiente en sus respectivos tiempos de muestreo, incluyendo los parámetros del agua experimental *in situ*.

### VARIABLES FÍSICOQUÍMICAS ANALIZADAS

Tabla 7. Agua experimental (in situ)

Temperatura (°C)	pH	Sólidos totales disueltos (µg/L)	Conductividad (µS/cm)	O2 disuelto (mg/L)
18.9	6.24	47.00	96.00	8.15

Tabla 8. Grupo Control (Acuario 1)

Tiempo (días)	Temperatura (°C)	pH	Sólidos totales disueltos (µg/L)	Conductividad (µS/cm)	O2 disuelto (mg/L)
Preexposición	20.90	7.11	61.00	126.00	8.07
6 horas	21.10	7.14	43,90	88,66	6.61
7 días	21.1	8.52	31.11	63,00	9.02
15 días	21.20	8.10	75,23	72,54	8.55

Tabla 9. Grupo Control (Acuario 2)

Tiempo (días)	Temperatura (°C)	pH	Sólidos totales disueltos (µg/L)	Conductividad (µS/cm)	O2 disuelto (mg/L)
Preexposición	20.90	7.33	47.56	96.00	8.13
6 horas	22.50	7.31	45,87	91.48	6.46
7 días	21.40	6.26	41,78	82.00	8.52
15 días	21.40	7,09	34,00	67.00	8.63

Tabla 10. Grupo Experimental (Acuario 1)

Tiempo (días)	Temperatura (°C)	pH	Sólidos totales disueltos (µg/L)	Conductividad (µS/cm)	O2 disuelto (mg/L)
Pre- exposición	21.20	7.37	43.70	98.23	8.64
6 horas	22.50	7.37	44.78	87.76	6.46
7 días	21.40	7.85	24.55	47.00	7.44
15 días	21.30	8.44	22.78	45.87	7.26

Tabla 11. Grupo Experimental (Acuario 2)

Tiempo (días)	Temperatura (°C)	pH	Sólidos totales disueltos (µg/L)	Conductividad (µS/cm)	O2 disuelto (mg/L)
Pre- exposición	22.50	7.44	51.53	103.60	8.11
6 horas	21.40	7.44	33.67	76.00	6.45
7 días	21.00	7.50	27.78	56.00	7.56
15 días	21.50	8.74	37.49	73.99	7.34

## 6. DISCUSIÓN

En el presente estudio, las técnicas de análisis no evidenciaron la formación de micronúcleos como biomarcador de genotoxicidad. La calidad de agua de tramo de río estudiado según los parámetros analizados estuvo en su mayoría dentro de los límites de la norma chilena 1.333 Of 78 tabla 4, para vida acuática (Correa, 1987) y la NSCA del río Biobío (Nacional, 2015). En este sentido la contaminación es multifacética para gran parte de la vida. La obtención de resultados negativos ha sido documentada anteriormente en estudios bajo condiciones de laboratorio. Un ejemplo de estos, son los trabajos citados por los autores Francesco D'Agostini y Sebastiano La Maestra, junto a Lassen et al., publicados el año 2021. Estos incluían el uso de metodologías comparables a nuestro trabajo, destacando el uso de la tinción de Feulgen, el recuento de un número estimado de 2000 eritrocitos y utilización de EDTA como anticoagulante para tubos de almacenamiento de muestras.

Estos resultados sugieren que la diferencia en la formación de micronúcleos respecto a los tiempos de exposición y muestreo no son estadísticamente significativos, por lo que se acepta la hipótesis nula. Pese a estos resultados se encontraron anomalías nucleares, las estas anomalías, como binucleación, puentes y brotes nucleares, sugieren la presencia de agentes genotóxicos en el agua del río Biobío.

Esto reafirma la participación de diversos factores en la respuesta ante genotóxicos y que la obtención de estos resultados negativos a la formación de micronúcleos no es un hecho aislado. En estudios con peces de la familia *Oreochromis*, expuestos a condiciones de laboratorio a efluentes provenientes de gasolineras, se comprobó la presencia de genotóxicos tales como xilol, benceno y tolueno, pero no se reportó un aumento en la frecuencia de micronúcleos. Sin embargo, se observaron anomalías nucleares en el grupo experimental (Oliveira-Martins y Grisolia, 2009).

Las estadísticas indican que hasta el año 2021, el 10% de los experimentos efectuados en condiciones de laboratorio presentaron resultados negativos a la formación de micronúcleos (Francesco D'Agostini y Sebastiano La Maestra, 2021). Estos resultados provienen, inclusive de estudios que aplicaron desechos de hospital previamente

reconocidos por su acción genotóxica, tales como plomo, níquel, cloroformo, tetracloruro de carbono, entre otros (Erbe et al., 2011; Baudou et al., 2019) los cuales, de igual manera obtuvieron resultados similares gracias a la utilización de cobre en cantidades mayores a las de consumo humano. Sus hallazgos son comparables en cantidad de micronúcleos y anormalidades nucleares con estudios de exposición a ciclofosfamida, la cual genera alteraciones bioquímicas, genotóxicas y metabólicas, tales como la variación de la ingesta de alimento y producción fecal.

Es importante señalar algunas limitaciones del test de micronúcleos. Este puede estar influenciado por factores fuera de nuestro control, tales como la naturaleza específica de los contaminantes del río Biobío. De igual manera, es relevante considerar que, tal como describen Stefania et al. (2009), factores como el tipo de célula y tejido utilizado de los especímenes pueden ocasionar variaciones en la probabilidad de formar micronúcleos. Esto sugiere la necesidad de realizar futuras investigaciones para comprender mejor las variables que afectan la inducción de micronúcleos (Ayllon y Garcia-Vazquez, 2000).

Aquellos resultados negativos a daño citogenético pueden tener su origen en la variedad de los factores fisiológicos propios de cada especie de pez e individuo. Sexo, edad, estatus hormonal y dieta constituyen elementos capaces de alterar las frecuencias de micronúcleos reportadas (Udroiu, 2006). Un ejemplo de estudio completo que abarca distintos parámetros de estimación de genotoxicidad es el de los autores Rabelo et al., (2021).

Realizar estudios comparativos con otras regiones y fuentes de agua puede ayudar a contextualizar los resultados con el fin de obtener una visión global de la genotoxicidad en cuerpos de agua de nuestro país ya que se reporta un vacío de información respecto a la genotoxicidad de las aguas de Chile, siendo este el primer estudio ejecutado bajo el test de micronúcleos en el río Biobío.

Se sugiere efectuar mayor cantidad de estudios no letales de la fauna nativa del país, con el fin de contrastar los resultados y evaluar las exposiciones crónicas de posibles agentes genotóxicos, con el propósito de realizar evaluaciones de impacto ambiental que promuevan la conservación de nuestra fauna silvestre y cuerpos de agua dulce.

## 7. CONCLUSIONES

No se encontraron diferencias significativas a la inducción de micronúcleos de sangre periférica de *Carassius auratus* expuestos a aguas del río Biobío. Es necesario abordar futuras investigaciones a través del uso de distintas pruebas de genotoxicidad en forma concomitante para obtener resultados más precisos en la estimación de genotoxicidad.

Se logró determinar la frecuencia de los micronúcleos en eritrocitos periféricos de *Carassius auratus* durante la exposición a las aguas del río Biobío mediante las técnicas utilizadas en este experimento.

La exposición prolongada de aguas provenientes del río Biobío, con potencial genotóxico, no presentó un aumento significativo en la presencia de micronúcleos, lo que implica que no se identificó una variable atribuible que impacte negativamente la integridad genética de los organismos acuáticos.

Es importante considerar las limitaciones del estudio presente, la variabilidad interindividual de los individuos junto con la sensibilidad de la respuesta a los contaminantes presentes en el río Biobío. Estos factores podrían haber influido en la ausencia de formación de micronúcleos.

## 8. REFERENCIAS

- Abdel-Khalek, A., Bin Dajem, S., y Morsy, K. (2020). The Long-Term Exposure to Discharges of Sabal Drain Induces Genotoxic Effects on *Oreochromis niloticus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 104(6), 858–863. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02856-3>
- Alonso, Á., Figueroa, R., y Castro-Díez, P. (2017). Pollution Assessment of the Biobío River (Chile): *Prioritization of Substances of Concern Under an Ecotoxicological Approach*. *Environmental management*, 59 (5), 856-869. <https://doi.org/10.1007/s00267-017-08245>
- Al-Sabti, K., y Metcalfe, D. (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 343(2), 121–135. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90078-0](https://doi.org/10.1016/0165-1218(95)90078-0)
- Anitha, B., Chandra, N., Gopinath, M., y Durairaj, G. (2000). Genotoxicity evaluation of heat shock in goldfish (*Carassius auratus*). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 469(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00029-2)
- Ardeshir, R., Movahedinia, A., y Rastgar, S. (2017). Fish liver biomarkers for heavy metal pollution: a review article. *American Journal of Toxicology*, 2(1), 1-8.
- Ayllon, F., y García-Vázquez, E. (2000). Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 467(2), 177– 186. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00033-4)
- Bahamonde, P., Berrocal, C., Barra, R., McMaster, M. E., Munkittrick, R., y Chiang, G. (2019). Mucus phosphoproteins as an indirect measure of endocrine disruption in native small-bodied freshwater fish, exposed to wastewater treatment plant and pulp and paper mill effluents. *Gayana*, 83(1), 10–20. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382019000100010>

- Balabanič, D., Filipič, M., Krivograd, A., y Žegura, B. (2017). Raw and biologically treated paper mill wastewater effluents and the recipient surface waters: Cytotoxic and genotoxic activity and the presence of endocrine disrupting compounds. *Science of The Total Environment*, 574, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.030>
- Barra, O., Chiang, G., Saavedra, F., Orrego, R., Servos, R., Hewitt, M., McMaster, E., Bahamonde, P., Tucca, F., y Munkittrick, R. (2021). Endocrine Disruptor Impacts on Fish From Chile: The Influence of Wastewaters. *Frontiers in Endocrinology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2021.611281>
- Baudou, F., Ossana, N., Castañé, P., Mastrángelo, M., González Núñez, A., Palacio, M., y Ferrari, L. (2019). Use of integrated biomarker indexes for assessing the impact of receiving waters on a native neotropical teleost fish. *Science of the Total Environment*, 650, 1779–1786.
- Bergamaschi, B., Rodrigues, M., Silva, J., Kluge, M., Luz, R., Fleck, J., Bianchi, E., Silva, L., y Spilki, F. (2015). Moving beyond classical markers of water quality: detection of enteric viruses and genotoxicity in water of the Sinos River. *Brazilian Journal of Biology*, 75(Suppl. 2), S63–S67.
- Bolognesi, C., y Hayashi, M. (2011). Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26(1), 205–213. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq073>
- Bonnineau, C., Moeller, A., Barata, C., Proia L., Sans-Piché, F., Schmitt-Jansen, M., Guasch, H., Segner, H. (2012) Advances in the multibiomarker approach for risk assessment in aquatic ecosystems. In: Guasch H, Ginebreda A, Geiszinger A (eds) *The handbook of environmental chemistry v.19 emergency and priority pollutants in rivers*. Springer, Berlin, pp 147–179
- Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dörr, A., y Rizzoni, M. (2004). Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research*, 557(2), 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.10.008>
- Canedo, A., Wender, L., Flávia, E., Lopes, T. (2021). Micronucleus test and nuclear abnormality assay in zebrafish (*Danio rerio*): Past, present, and future trends.

- Environmental Pollution*, 290, 118019.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118019>
- Cantu, E., Rivera, M., Lacy, B., y Rahman, M. (2023). Effects of short-term exposure to a pesticide mixture on free-swimming behavior in goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 11, 100350.  
<https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2023.100350>
- Cavas, T. (2011). In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1431–1435.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.038>
- Cavas, T., y Könen Adıgüzel, S. (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 22, 263–268. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem012>
- Chieco, P., y Derenzini, M. (1999). The Feulgen reaction 75 years on. *Histochemistry and Cell Biology*, 111(5), 345–358. <https://doi.org/10.1007/s004180050367>
- Dos Santos, S., Viana, L., Merey, F., Crispim, B., Solorzano, J, Barufatti, A., Cardoso, C. y Lima-Junior, S. (2020). Evaluation of the water quality in a conservation unit in Central-West Brazil: Metals concentrations and genotoxicity in situ. *Chemosphere*, 251, 126365. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126365>
- Erbe, M., Ramsdorf, W., Vicari, T., y Cestari, M. (2011). Toxicity evaluation of water samples collected near a hospital waste landfill through bioassays of genotoxicity piscine micronucleus test and comet assay in fish *Astyanax* and ecotoxicity *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, 20, 320–328
- Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Holland, N., Bonassi, S., y Kirsch-Volders, M. (2020). Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 786, 108342.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108342>

- Fierro, P., Valdovinos, C., Arismendi, I., Díaz, G., Ruiz de Gamboa, M., y Arriagada, L. (2019). Assessment of anthropogenic threats to Chilean Mediterranean freshwater ecosystems: Literature review and expert opinions. *Environmental Impact Assessment Review*, 77, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.eiar.2019.02.010>
- D'Agostini, F., y La Maestra, S. (2021). Micronuclei in fish erythrocytes as genotoxic biomarkers of water pollution: An overview. En P. de Voogt (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 195). Springer. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-03088326-3.pdf>
- Gadhia. (2016) Cypermethrin induced DNA damage in *Labeo rohita* assessed by comet assay. *Int J Environ Sci* 6:1113–1116
- Gore, A., Chappell, V., Fenton, S., Flaws, J., Nadal, A., G., Toppari, J., y Zoeller, T. (2015). Executive Summary to EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews*, 36(6), 593–602. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1093>
- Grisolia, C., Rivero, C., Starling, F., da Silva, I., Barbosa, A., y Dorea, J. (2009). Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and Molecular Biology*, 32, 138–143.
- Guerra, A., Roque, F., Garcia, L., Ochoa-Quintero, M., Oliveira, P., Guariento, R., y Rosa, D. (2020). Drivers and projections of vegetation loss in the Pantanal and surrounding ecosystems. *Land Use Policy*, 91, 104388. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2019.104388>
- Guo, X., Ni, J., Liang, Z., Xue, J., Fenech, M., y Wang, X. (2019). The molecular origins and pathophysiological consequences of micronuclei: New insights into an ageold problem. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 779, 1–35. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.11.001>
- Gutiérrez, J., Villar, S., y Acuña Plavan, A. (2015). Micronucleus test in fishes as indicators of environmental quality in subestuaries of the Río de la Plata (Uruguay). *Marine Pollution Bulletin*, 91(2), 518–523. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.027>

- Haq, I., Kumar, S., Raj, A., Lohani, M., y Satyanarayana, G. (2017). Genotoxicity assessment of pulp and paper mill effluent before and after bacterial degradation using *Allium cepa* test. *Chemosphere*, 169, 642–650. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.101>
- Hussain, B., Sultana, T., Sultana, S., Masoud, M., Ahmed, Z., y Mahboob, S. (2018). Fish eco-genotoxicology: Comet and micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ biomarker of freshwater pollution. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.048>
- Islas-Flores, H., Manuel Gómez-Oliván, L., Galar-Martínez, M., Michelle SánchezOcampo, E., SanJuan-Reyes, N., Ortíz-Reynoso, M., y Dublán-García, O. (2017). Cyto-genotoxicity and oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to a mixture of Ibuprofen and Diclofenac. *Environmental Toxicology*, 32(5), 1637–1650. <https://doi.org/10.1002/tox.22392>
- Jiang, H., Panda, S., y Gekara, N. (2019). Chapter Eighteen - Comet and micronucleus assays for analyzing DNA damage and genome integrity. In J. Sohn (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 625, pp. 299–307). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.05.015>
- Klobucar, G, Stambuk, A., Pavlica, M., Sertić, M., Kutuzović, B., y Hylland, K. (2010). Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology (London, England)*, 19(1), 77–84. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0390-6>
- KOPPEN, W. (1948) *Climatología: Con un Estudio de los Climas de la Tierra*. Fondo de Cultura Económica, México.
- Krupina, K., Goginashvili, A., y Cleveland, D. (2021). Causes and consequences of micronuclei. *Current Opinion in Cell Biology*, 70, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.01.004>
- Kumar, A., Kesari, V., y Khan, K. (2013). Fish micronucleus assay to assess genotoxic potential of arsenic at its guideline exposure in aquatic environment. *BioMetals*, 26(2), 337–346. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9620-8>

- Lassen, M., Frohlich, J., Barcelos, R., Klein, R., Borba, F., y Baroni, S. (2021). Cell damage in *Danio rerio* erythrocytes subjected to anthropized water. *Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 16, 1. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2577>
- Li, X., Zang, N., Zhang, N., Pang, L., Lv, L., Meng, X., Lv, y Leng, J. (2023). DNA damage resulting from human endocrine disrupting chemical exposure: Genotoxicity, detection and dietary phytochemical intervention. *Chemosphere*, 338, 139522. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139522>
- Linde, A., Sánchez-Galán, S., Izquierdo, J., Arribas, P., Marañón, E., y GarcíaVázquez, E. (1998). Brown Trout as Biomonitor of Heavy Metal Pollution: Effect of Age on the Reliability of the Assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40(1), 120–125. <https://doi.org/10.1006/eesa.1998.1652>
- Maurya, P., y Malik, D. (2019). Bioaccumulation of heavy metals in tissues of selected fish species from Ganga river, India, and risk assessment for human health. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 25(4), 905–923. <https://doi.org/10.1080/10807039.2018.1456897>
- Mello, M., Vidal, B. (2017). The Feulgen reaction: A brief review and new perspectives. *Acta Histochemica*, 119(6), 603–609. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.07.002>
- Oliveira, C., Souto, P., Palheta, D., Bahia, M., Cunha, L., Santos, M., Rodrigues, T., y Bentes, B. (2021). Evaluation of the Genotoxicity in Fish Erythrocytes to Diagnose the Water Quality of Two Amazonian Estuaries Using the Micronucleus Test and Comet Assay. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-849055/v2>
- Oliveira-Martins, C., y Grisolia, C. (2009). Toxicity and genotoxicity of wastewater from gasoline stations. *Genetics and Molecular Biology*, 32, 853–856.
- Orozco-Hernández, J., Gómez Oliván, L., Heredia-García, G., Luja-Mondragón, M., Islas-Flores, H., SanJuan-Reyes, N., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., y Dublán-García, O. (2019). Genotoxic and cytotoxic alterations induced by environmentally-relevant concentrations of amoxicillin in blood cells of *Cyprinus carpio*. *Chemosphere*, 236, 124323. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.054>

- Ossana, N. A., Baudou, F. G., Castañé, P. M., Tripoli, L., Soloneski, S., y Ferrari, L. (2019). Histological, Genotoxic, and Biochemical Effects on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns 1842) (Cyprinodontiformes, Poeciliidae): Early Response Bioassays to Assess the Impact of Receiving Waters. *Journal of Toxicology*, 2019, 4687685. <https://doi.org/10.1155/2019/4687685>
- Polard T, Jean S, Gauthier L, Laplanche C, Merlina G, Sánchez-Pérez JM, Pinelli E (2011a) Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in southwest France. *Aquat Toxicol* 101:126–134
- Quiroz-Jara, M., Casini, S., Fossi, M., Orrego, R., Gavilán, J., y Barra, R. (2021). Integrated Physiological Biomarkers Responses in Wild Fish Exposed to the Anthropogenic Gradient in the Biobío River, South-Central Chile. *Environmental Management*, 67(6), 1145–1157. <https://doi.org/10.1007/s00267-021-01465-y>
- R Core Team. (2024). *\*R: A language and environment for statistical computing\**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rabelo, J. C. S., Hanusch, A. L., Jesus, L. W. O., Mesquita, L. A., Franco, F. C., Silva, R. A., & Sabóia-Morais, S. M. T. (2021). *DNA damage induced by cylindrospermopsin on different tissues of the biomonitor fish Poecilia reticulata*. *Environmental Toxicology*, 36(6), 1125–1134. doi:10.1002/tox.23111.
- Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F., y Garcia-Vazquez, E. (2003). Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(3), 442–448. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00073-3](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00073-3)
- Saavedra, M. (2015). *Evaluación de los efectos de efluentes de plantas tratamiento de aguas servidas sobre oncorhynchus mykiss mediante el uso de experimentos de laboratorio y terreno en la cuenca del río Biobío*. <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/1860>
- Samanta, P., Im, H., Na, J., y Jung, J. (2018). Ecological risk assessment of a contaminated stream using multi-level integrated biomarker response in *Carassius auratus*. *Environmental Pollution*, 233, 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.061>

- Schlenk, D. (1999). Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin* 39, 48-53.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31(1), 9–15. [https://doi.org/10.1016/01651161\(75\)90058-8](https://doi.org/10.1016/01651161(75)90058-8)
- Shapiro, S.S. y Wilk, M.B. (1965). An analysis of variance test for normality (Complete samples). *Biometrika*, 52(3/4): 591. doi: 10.2307/2333709.
- Silva, D., Gonçalves, B., Rodrigues, C., Dias, F., Trigueiro, N., Moreira, I., de Melo e Silva, D., Sabóia-Morais, S., Gomes, T., y Rocha, T. (2021). A multibiomarker approach in the caged neotropical fish to assess the environment health in a river of central Brazilian Cerrado. *Science of The Total Environment*, 751, 141632. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141632>
- Sommer, S., Buraczewska, I., y Kruszewski, M. (2020). Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms21041534>
- Stefania, G., Maura, B., Claudia, V., Barbara, P., Ginevra, M., y Francesco, R. (2009). Biological effects of diethylene glycol (DEG) and produced waters (PWs) released from offshore activities: A multi-biomarker approach with the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Environmental Pollution*, 157(11), 3166–3173. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.021>
- Tan, D., Li, L., Wang, S., Wei, B., Zhang, X., Sun, B., y Ji, S. (2013). The cytogenetic effects of acrylamide on *Carassius auratus* periperial blood cells. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 318–322. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.077>
- Tierno de Figueroa, J. M., López-Rodríguez, M., Fenoglio, S., Sánchez-Castillo, P., y Fochetti, R. (2013). Freshwater biodiversity in the rivers of the Mediterranean Basin. *Hydrobiologia*, 719(1), 137–186. <https://doi.org/10.1007/s10750-0121281-z>
- Udroiu, I. (2006). The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*, 79(2), 201–204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.013>. PMID:16846653

- Venturoti, G., Boldrini-França, J., Kiffer, W., Francisco, A., Gomes, A., y Gomes, L. (2019). Toxic effects of ornamental stone processing waste effluents on *Geophagus brasiliensis* (Teleostei: Cichlidae). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 72, 103268. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103268>
- Viana, L., Crispim, B., Kummrow, F., Aragão do Nascimento, V., Silva de Pádua, E., de Lima, N., y Barufatti, A. (2022). Bioaccumulation, genotoxicity, and risks to native fish species from inorganic contaminants in the Pantanal Sul-MatoGrossense, Brazil. *Environmental Pollution*, 314, 120204. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120204>
- Viganò, L., De Flora, S., Gobbi, M., Guiso, G., Izzotti, A., Mandich, A., Mascolo, G., y Roscioli, C. (2015). Exposing native cyprinid (*Barbus plebejus*) juveniles to river sediments leads to gonadal alterations, genotoxic effects and thyroid disruption. *Aquatic Toxicology*, 169, 223–239. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.022>
- Vila, I., y Habit, E. (2014). Current situation of the fish fauna in the Mediterranean region of Andean river systems in Chile. *FISHMED Fishes in Mediterranean Environments*, a002, 1–19. <https://doi.org/10.29094/FiSHMED.2015.002>
- Walia, G., Handa, D., Kaur, H., y Kalotra, R. (2015). Ecotoxicological studies on fish, *Labeo rohita* exposed to tannery industry effluent by using micronucleus test. *The Nucleus*, 58(2), 111–116. <https://doi.org/10.1007/s13237-015-0140-5>
- Wilcoxon, F. (1945). Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bulletin*, 1(6): 80. doi: 10.2307/3001968.
- Zhou, Q., Yang, N., Li, Y., Ren, B., Ding, X., Bian, H., y Yao, X. (2020). Total concentrations and sources of heavy metal pollution in global river and lake water bodies from 1972 to 2017. *Global Ecology and Conservation*, 22, e00925. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e00925>

## 9. ANEXOS

### **Anexo I: Tinción de Feulgen.**

El reconocimiento de estructuras correspondientes a micronúcleos consideró la aplicación de la técnica de Feulgen que tiñe específicamente material nuclear, es decir tanto ADN como ARN, esta técnica fue aplicada sobre extendidos sanguíneos confeccionados a partir de las muestras de sangre obtenidas de los peces que conforman los dos grupos de estudio. Se fijaron los extendidos con alcohol y xilol. La metodología diseñada por Feulgen y Rossenbeck consideró efectuar una hidrólisis suave utilizando ácido clorhídrico a una concentración 1 molar lo que condiciona la ruptura del enlace que se establece entre la base nitrogenada y el azúcar desoxirribosa. Esta fractura de los enlaces trae como consecuencia una exposición de los grupos químicos aldehídos que se vuelven fácilmente teñidos por el reactivo de Schiff, evidenciando la presencia de ADN en la estructura teñida. (Mello y Vidal, 2017; Chieco y Derenzini, 1999).

Las muestras fueron fijadas inicialmente utilizando solución fijadora de Carnoy durante al menos 1 hora. Luego, se procedió a deshidratar las muestras mediante una serie de soluciones alcohólicas con concentraciones crecientes de 70%, 95% y 100%. Las muestras permanecieron sumergidas durante 2 minutos en cada solución, asegurando una eliminación gradual del agua y preparándolas para los pasos posteriores.

Una vez deshidratadas, las muestras fueron hidrolizadas utilizando ácido clorhídrico (HCl) 5N. Inmediatamente después de la hidrolización, las muestras fueron transferidas al reactivo de Schiff, el cual se encontraba a temperatura ambiente. Las muestras permanecieron sumergidas en este reactivo durante 45 minutos, tiempo suficiente para que el ADN adquiriera el color púrpura característico de la reacción de Feulgen.

Posteriormente, las muestras fueron lavadas cuidadosamente con agua sulfurosa para eliminar el exceso de reactivo y mejorar la calidad del teñido. Una vez finalizado este paso, se llevó a cabo una nueva deshidratación utilizando la misma serie de alcoholes (70%, 95% y 100%), sumergiendo las muestras nuevamente durante 2 minutos en cada solución.

Finalmente, las muestras fueron aclaradas en xilol durante un periodo de 5 a 10 minutos. Este paso preparó las muestras para su montaje final. Para concluir, las muestras fueron montadas en un medio hidrófobo de montaje (resina), colocadas bajo un cubreobjetos y selladas adecuadamente. El material así preparado quedó listo para su observación y análisis microscópico.

## Anexo II: Listado de materiales utilizados.

### Individuos:

- 30 individuos especímenes de *Carassius auratus* juveniles

### Materiales fungibles:

- 300 Jeringas de 3 ml
- 250 Gr de algodón hidrófilo (American ®)
- 120 Tubos tapón lila (EDTA) al vacío de 0,05 ml
- 200 Portaobjetos doble franja esmerilada
- 200 Cubre Objetos 24x50 mm
- 1 Caja de 100 unidades de guantes de nitrilo talla S (Top Glove ®)
- 1 set de 40 "Tiras reactivas 6 en 1" marca (Tropical ®)
- 1 Envase de 250 gramos de alimento "Goldfish & Color" (Tropical®)
- 3 Cajas de con doble franja esmerilada
- 1 Biofiltro (Dajana ®)

### Materiales no fungibles:

- 4 Acuarios de 100 litros
- 4 Filtros de esponja 1000 Lt/hr (Sobo ® SB-1330)
- 1 Sifón (Boyu ®)
- 2 Redes para acuario (Boyu ®)
- 1 Balanza (Calfax ®)
- 1 Recipiente de plástico ovalado de 2,5 litros (Genérico)
- 3 Termómetros flotantes para acuario (Boyu ®)
- 10 metros de manguera de plástico para acuarios (Sera ®)
- 3 Bombas de aire de dos entradas (Sobo ® SB-9905A)
- pHmetro digital Hanna®

Reactivos:

- 1 Litro de solución de ácido clorhídrico 1 molar
- 0,25 Litros de reactivo de Schiff (Merck ®)
- 2 Litros de HCl 5N
- 0,5 Litros de solución fijadora de Carnoy
- 0,05 Litros de medio de montaje hidrófobo
- 2 Litros de Xilol
- 2 Litros de alcohol etílico al 70% (DifemPharma ®)
- 2 Litros de alcohol absoluto 100%
- 0,5 Litros de agua sulfurosa
- 2 litros de alcohol desnaturalizado 95° (DifemPharma ®)

Contabilización:

- 1 Microscopio (Leica Alemania ® DM500)
- 1 Cámara fotográfica (Leica Alemania ® CC50W)

### Anexo III: Cálculo de frecuencia de micronúcleos.

Para la cuantificación se contaron todos los micronúcleos al igual que el total de células por cada campo microscópico.

La frecuencia de MN fue calculada usando las siguientes ecuaciones matemáticas propuestas por Al-Sabti y Metcalfe (1995) y (Jiang et al., 2019):

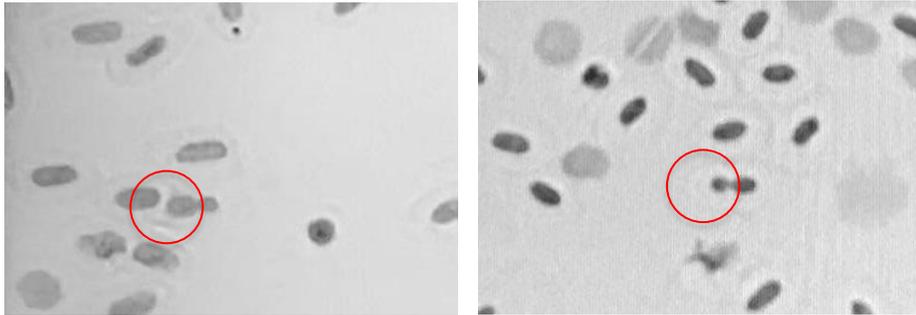
$$\text{MN \%} = \frac{\text{Número de células conteniendo micronúcleos}}{\text{Número total de células contadas}} \times 100$$

$$\frac{\text{MN}}{\text{célula}} = \frac{\text{Número de micronúcleos por célula}}{\text{Número total de células contadas}} \times 100$$

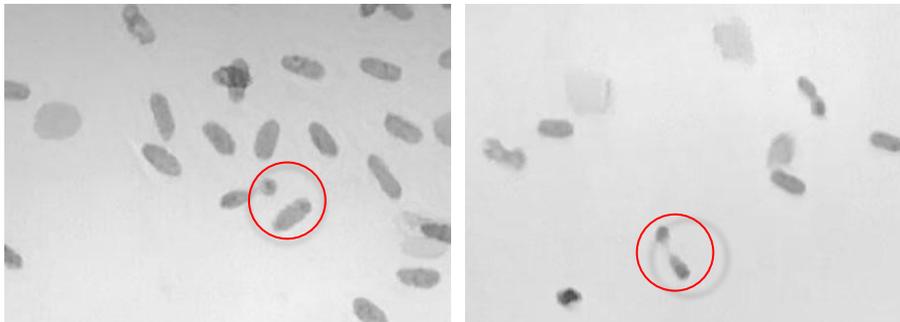
**Anexo IV: Micronúcleos y anomalías nucleares identificadas.**



**Figura 2.** A) Formación de micronúcleos, B) Anormalidades en células de *Carassius auratus*, magnificación 1000x.



**Figura 3.** Brotes nucleares en eritrocitos de sangre periférica de *Carassius auratus*, magnificación 1000x.



**Figura 4.** Puentes nucleares en eritrocitos de sangre periférica de *Carassius auratus*, magnificación 1000x.

## Anexo V: Formulario del CECUA para el uso de animales en investigación.

 <b>UNIVERSIDAD SAN SEBASTIAN</b> <small>PROFESOR HUMANISTA CRISTIANO</small>	<b>PROTOCOLO DE CUIDADO Y USO DE ANIMALES</b> Comité Institucional de Ética en Cuidado y Uso de Animales, USS Versión pre grado 2023
--	--

<b>Código asignado por el Comité</b>	
<b>Fecha envío Versión 1</b>	<b>11 de diciembre del 2023</b>
<b>Versión (marcar con X)</b>	1 X    2    3    4    Otra:
<b>Fecha envío (formato xx/xx/xxxx)</b>	<b>11 de diciembre del 2023</b>

<b>Fecha aprobación (formato xx/xx/xxxx)</b>	
<b>Versión aprobada</b>	

### 1. ANTECEDENTES ADMINISTRATIVOS

<b>1.1 Título del proyecto/ protocolo/ actividad:</b>	EVALUACIÓN DE MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA EN <i>Carassius auratus</i> COMO BIOMARCADOR DE GENOTOXICIDAD
<b>1.2 Fuente de Financiamiento(s) y número asignado por la agencia en caso que corresponda</b>	
<b>1.3 Indicar si esta investigación es: proyecto piloto; unidad de investigación/ tesis de pregrado/ doctorado/ magister/ docencia/extensión/ demostración (etc.):</b>	Tesis de pregrado.
<b>1.4 Otras instituciones participantes</b>	

### 1.5 EQUIPO

<b>Nombre</b>	Valentina Andrea Almeyda Moya
<b>Institución</b>	Universidad San Sebastián
<b>Email</b>	valmeydam@correo.uss.cl
<b>Categoría académica si corresponde</b>	Estudiante
<b>Rol en este proyecto</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> Profesor guía <input checked="" type="checkbox"/> Investigador principal <input checked="" type="checkbox"/> Lab manager <input type="checkbox"/> Personal técnico o profesional <input type="checkbox"/> Profesional externo	<input type="checkbox"/> Académico Responsable USS <input type="checkbox"/> Tesista doctorado <input checked="" type="checkbox"/> X Tesista de pre-grado <input type="checkbox"/> Estudiante de pre o postgrado <input type="checkbox"/> Otro
<b>Capacitación formal en Ética Animal</b> Marcar con X dentro del cuadrado:	SI (Adjunte certificado) <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>

NOTA: Documento adaptado del PROTOCOLO DE CUIDADO Y USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN; Comité Ético Científico para el Cuidado de Animales y Ambiente (CEC-CAA), Pontificia Universidad Católica de Chile; Versión 2020.

Página 1 de 1