

Cito y genotoxicidad en eritrocitos de tortugas *Trachemys sp* sometidas a diferentes concentraciones de metil-mercurio

Plazas, G.D.¹; Velandia, C.A.¹; Rey, V.¹; Rodríguez, M.P.²; Hernández, J.A.²

¹Fac.Cs.Salud, Bact.& Lab.Clinico, UCMC; ²Dpto.C.Biol.Amb.UJTL.
Código Postal 110311. Fax (+571)2427030. Bogotá, Colombia.
E-mail: javier.hernandez@utadeo.edu.co

Resumen

Plazas, G.D.; Velandia, C.A.; Rey, V.; Rodríguez, M.P.; Hernández, J.A.: Cito y genotoxicidad en eritrocitos de tortuga *Trachemys sp* sometidas a diferentes concentraciones de metil-mercurio. *Rev. Vet.* 33: 1, 32-40, 2022. El metil mercurio (MeHg) es un contaminante ambiental tóxico y nocivo que se bioacumula y biomagnifica en la cadena trófica. La tortuga *Trachemys scripta elegans* (*Tse*), considerada centinela de contaminación ambiental debido a su longevidad, posee eritrocitos (RBCs) nucleados con afinidad del 90% por MeHg. Este estudio determinó la citotoxicidad y genotoxicidad *in vitro* del MeHg sobre RBCs de *Tse* a concentraciones de 0, 0,5, 0,7, 1, 10, 20, 50 y 100 mg/L⁻¹ a las 24 y 96 h de exposición. Los RBCs se aislaron por centrifugación y se emplearon 1,69 x 10⁶ RBCs por tratamiento. Se determinó el porcentaje de viabilidad, concentración letal media (CL₅₀) y se verificaron cambios citológicos a las 24 y 96 h. El ADN fue extraído a las 96 h y se evaluó la genotoxicidad por marcadores RAPDs calculando el porcentaje de polimorfismo, índice de estabilidad genética (GST) y coeficiente de disimilaridad de Jaccard (dJSC). A las 96 h la viabilidad a 0,5, 0,7 y 1 mg·L⁻¹ de MeHg fue del 99% y 10, 20, 50 y 100 mg·L⁻¹ de MeHg fue de 94%, 20% y 0%. La CL₅₀ determinada en 22,55 mg·L⁻¹ de MeHg. El análisis celular mostró en las diferentes concentraciones de MeHg, inclusiones citoplasmáticas, desvanecimiento o ruptura de membrana, núcleos excéntricos y lisis celular. El polimorfismo identificado fue del 85% y 50% y dJSC de 0,5 y 0,63 en 50 a 100 mg·L⁻¹ de MeHg comparado con el grupo control. La GST disminuyó hasta 42% a 100 mg·L⁻¹ de MeHg. Se concluye que el MeHg es citotóxico y genotóxico a concentraciones mayores de 10 mg·L⁻¹ en RBCs de *Tse*. Este estudio representa una línea base para estudios en toxicología por Hg en RBCs de *Tse*.

Palabras clave: tortuga, eritrocitos, metil mercurio, dosis letal 50, estabilidad genética, metil-mercurio.

Abstract

Plazas, G.D.; Velandia, C.A.; Rey, V.; Rodríguez, M.P.; Hernández, J.A.: Cyto and xeno toxicity in turtle *Trachemys sp* erythrocytes subjected to different concentrations of methyl-mercury. *Rev. Vet.* 33: 1, 32-40, 2022. Methyl mercury (MeHg) is a xenobiotic that bioaccumulates and bio-magnifies in the food chain. The *Trachemys scripta elegans* (*Tse*) turtle is considered a sentinel of environmental pollution because of its longevity. *Tse* has nucleated erythrocytes (RBCs) with 90% affinity for MeHg. This study determined cyto-toxicity and geno-toxicity *in vitro* of MeHg on *Tse* RBCs at concentrations of 0, 0.5, 0.7, 1, 10, 20, 50 and 100 mg·L⁻¹ at 24 and 96 h of exposure. The RBCs were isolated by centrifugation and 1.69 x10⁶ RBCs per treatment were used. The percentage of viability, mean lethal concentration (LC₅₀) and cytological changes were determined at 24 and 96 h. It was evaluated the xeno toxicity by RAPDs markers with extracted DNA at 96 h, calculating the percentage of polymorphism, index of genetic stability (GST) and coefficient of Jaccard dissimilarity (dJSC). At 96 h, viability was maintained between 99-0% in 0.5-100 mg L⁻¹ of MeHg. The LC₅₀ was 22.55 mg L⁻¹ MeHg. Cytological abnormalities were presented in 0.7-100 mg·L⁻¹ MeHg as crescent shape, cytoplasmic inclusions, membrane fading, eccentric nuclei and cell lysis. The polymorphism was 85-50% and the dJSC was 0.5-0.63 in 50-100 mg·L⁻¹ MeHg compared to the control group. GST decreased to 42% at 100 mg·L⁻¹ MeHg. It is concluded that MeHg is cytotoxic and genotoxic at concentrations greater than 10 mg·L⁻¹ in *Tse* RBCs. This study represents a baseline for Hg toxicological studies in reptile RBCs.

Key words: *Trachemys scripta elegans*, erythrocytes, lethal dose 50, genetic stability, methyl mercury.

INTRODUCCIÓN

Colombia enfrenta problemáticas de contaminación ambiental, causadas por abuso de sustancias químicas en explotación minera, especialmente oro, actividad que representa el principal foco de contaminación por mercurio (Hg). Este Hg desemboca por *escorrentía* a los cuerpos de agua por su uso en los pequeños molinos de bolas, lavados y amalgamación^{27,38}.

Según los reportes de la Agencia Nacional de Minería, Colombia ha presentado un aumento en la producción de oro, ya que en 2013 se produjeron 66 toneladas de oro, 6% por encima de la meta oficial; respecto al segundo periodo del presente año (2020) se reportó una producción de 76 toneladas, 16% por encima de la meta.

Ello fue debido a que las instituciones o entidades que regulan la actividad minera no logran recopilar la información esencial sobre las metodologías de extracción, la forma y cantidad en que el Hg es empleado para la explotación aurífera informal de los yacimientos en las diferentes regiones del país, como: Antioquia, Bolívar, Cauca, Chocó, Caldas, Córdoba, Nariño, Risaralda y Tolima^{1,27}.

El Hg es producido naturalmente por volcanes, sedimentos oceánicos, desgasificación de la corteza e incendios forestales, y antropogénicamente por la fabricación de cloro alcalinos, combustión de combustibles fósiles y minería del oro².

El Hg se encuentra como metal líquido o como catión, ya sea Hg^0 o Hg_2^{2+} , formando diversos compuestos, teniendo propiedades distintas en función de su estado. En el medio ambiente, exceptuando la atmósfera, el Hg se encuentra en forma de sales mercuricas inorgánicas y compuestos organo-mercuriales. Los compuestos de mercurio más comunes en el medio ambiente son: las especies inorgánicas $Hg(II)$, $HgCl_2$, $Hg(OH)_2$, HgS y compuestos de metilmercurio: CH_3HgCl y CH_3HgOH (ATSDR²; Gaona¹⁹, Sanchez³³).

El metil-mercurio (MeHg) es problemático por su bioacumulación y bio-magnificación en peces de agua dulce y salada y en mamíferos acuáticos². En cuanto a la toxicidad de las diferentes especies de mercurio, la pared intestinal actúa como barrera para formas inorgánicas, aunque sin embargo es permeable al MeHg.

El MeHg, al tener contacto con el organismo, inicia el proceso de bio-acumulación y bio-magnificación del metal, dándose preferentemente en el tejido muscular en proporciones de hasta 50% de la dosis total de mercurio circulante, también puede darse por el sistema respiratorio y/o por vía cutánea^{19,26,38}.

El movimiento del MeHg en la fauna silvestre se da por la cadena trófica, las especies u organismos pequeños lo acumulan y este pasa a especies más grandes cuando son ingeridos, la mayor parte del MeHg acumulada en la especie pequeña se bio-acumulará en la especie más grande (ASTDR, 1999)², el proceso se beneficia por el tiempo de vida que puedan tener las especies contaminadas porque aumenta el nivel de Hg en la cadena trófica.

De acuerdo a investigadores³⁷, los animales pueden purgar sus cuerpos del Hg bio-acumulado a través de la orina, las heces, la espiración y el aliento, o secuestrándolo en componentes corporales inertes como el pelo, las plumas, las garras, las conchas y el caparazón; las hembras pueden eliminar Hg cuando depositan sus huevos o dan a luz las crías, mecanismo no disponible para los machos^{7,11,25}.

La tortuga *Trachemys scripta elegans* (*Tse*) es una tortuga exótica de agua dulce proveniente de Norteamérica que se encuentra activa en pisos térmicos cálidos (entre 10 y 37°C) y una temperatura del aire y agua entre 22 y 26°C³². En Colombia, *Tse* es categorizada como especie invasora debido a su comercialización como mascota a nivel local, convirtiéndola en un animal amenazante para las especies autóctonas del país, debido a su potencial colonizador³².

Tse es considerada una especie centinela de contaminación ambiental debido a su longevidad y susceptibilidad a la bioacumulación de xenobióticos, y a que sus eritrocitos nucleados (RBCs) poseen una alta afinidad por MeHg, el cual se une a grupos tioles (SH) y a moléculas de bajo peso molecular que circulan en el plasma. De acuerdo con este comportamiento y la baja tasa metabólica de las tortugas, el MeHg puede bio-acumularse y bio-magnificarse en órganos como el hígado, el cerebro, los riñones y los músculos de las tortugas^{8,40}.

El objetivo del estudio fue determinar la citotoxicidad y genotoxicidad *in vitro* en eritrocitos de tortugas *Trachemys scripta elegans* producido por exposición aguda a diferentes concentraciones de MeHg. Se determinó adicionalmente la viabilidad y la concentración letal media (CL_{50}), y se registraron anomalías citológicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Toma de muestras

Se recolectaron muestras de sangre total de la aleta dorsal de 2 tortugas *Trachemys scripta elegans* (*Tse*) procedentes del Centro de Rehabilitación y Rescate de Fauna Silvestre de la Universidad Nacional de Colombia (URRAS). Para la toma de la muestra se empleó jeringa estéril de 5 mL y dos tubos heparinizados de mL BD Vacutainer®. Las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Ciencias Biológicas y Ambientales para ser almacenadas a 4°C en la Universidad Jorge Tadeo Lozano.

Aislamiento y pre-adaptación de eritrocitos

Los eritrocitos (RBCs) de tortugas *Tse* fueron aislados por centrifugación a 3500 rpm por 5 minutos a 4°C. Residuos de plasma y *buffy coat* fueron removidos. El pellet de RBCs resultante fue lavado cinco veces con buffer fosfato solución salina (PBS 0.9% pH 7.4). Alícuotas con 20 μ L de RBCs fueron resuspendidas en 980 μ L de Medio Mínimo Esencial (MEM) (Gibco, Grand Island, NY, USA) suplementado con bicarbona-

to de sodio, 13% de suero fetal bovino (SFB), y 1% de antibiótico penicilina/ estreptomycin (100 mg/L, penicilina, 10 mg/L, estreptomycin) (MEM-S). Los RBCs fueron preadaptados por 24 h a 30°C y luego utilizados en los bio-ensayos.

Bio-ensayos

Se preparó una solución stock de 1000 mg·L⁻¹ de MeHg (Sigma Aldrich) diluyendo el mercurio orgánico (cloruro de metil-mercurio, CH₃HgCl) en una solución de DMSO al 1%. A partir de esta solución stock se prepararon en solución salina estéril 0,85% siete soluciones de MeHg, en concentraciones finales de 0,5, 0,7, 1, 10, 20, 50 y 100 mg·L⁻¹, las cuales fueron utilizadas para los bio-ensayos. Luego, 1,69 x 10⁶ RBCs de *Tse* fueron expuestos *in vitro* a concentraciones de 0, 0,5, 0,7, 1, 10, 20, 50 100 mg·L⁻¹ MeHg a 30°C en medio MEM-S y se evaluó la viabilidad de las células a las 24 y 96 h. Se determinó la CL₅₀ a las 96 horas de exposición y se realizaron 5 réplicas por tratamiento en alícuotas de 200 µL.

Evaluación de citotoxicidad y cálculo de CL₅₀

En tubos *Eppendorf* de 100 µL se mezclaron de forma individual 10 µL de RBCs provenientes de cada uno de los tratamientos del bioensayo y se mezclaron con 10 µL de azul tripán al 0.4% (v/v) (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) ²⁹. Las mezclas individuales de RBCs-azul tripán se incubaron por 5 min a temperatura ambiente, y después, una alícuota de 10 µL de cada una de las mezclas fue servida en cámara de Neubauer (Zeiss, Oberkochen, Germany). Los RBCs viables y no viables fueron contados utilizando un microscopio Leica DM750 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) con un lente de 40X de magnificación. El porcentaje de viabilidad se calculó utilizando la siguiente fórmula: $(\text{células vivas} / (\text{células vivas} + \text{muertas}) * 100)$. Con base en los datos de viabilidad registrados en cada uno de los grupos experimentales (0, 0,5, 0,7, 1, 10, 20, 50 100 mg·L⁻¹MeHg) en el bioensayo, se determinó la CL₅₀ utilizando regresión lineal Probit, empleando el paquete estadístico MASS diseñado para software libre Rwizard ²¹.

Identificación de anomalías citológicas

Alícuotas de 10 µL de RBCs provenientes de cada uno de los grupos experimentales del bioensayo fueron extendidos en láminas portaobjetos y teñidos con Giemsa al 20% y formaldehído al 16%. Se registraron anomalías nucleares y citoplasmáticas utilizando un microscopio Leica DM750 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) con una lente de 40X de magnificación.

Evaluación de la genotoxicidad. Extracción del ADN

A las 96 horas se extrajo ADN de los RBCs de *Tse* sometidos a siete concentraciones de MeHg (0,5, 0,7, 1, 10, 20, 50, 100 mg·L⁻¹) y el control negativo y el control de citotoxicidad (DMSO 1%) con el *kit GF-1 Blood*

DNA Extraction Kit (Vivantis, No. Cat. GF-BD-050) el cual emplea una metodología de membrana de sílica gel para extracción de ADN. A los RBCs de los controles (CN y DMSO1%) y las siete concentraciones de MeHg se agregó 200 µL de buffer BB más 20 µL de Proteinasa K y 200 µL de etanol absoluto al 100%. Posteriormente, se transfirió la muestra a una columna de Sílica Gel y se centrifugó a 5000 g por un minuto eliminando el sobrenadante. Luego se lavó la columna con 500 µL de Wash Buffer 1 y se centrifugó a 5000 g por un minuto eliminando el sobrenadante, se realizó un segundo lavado adicionando 500 µL de Wash buffer 2 y se centrifugó a 5000 g por un minuto eliminando el sobrenadante. Adicionalmente se realizó un tercer lavado con 500 µL de Wash Buffer 2 y se centrifugó a 1200 rpm por tres minutos. El ADN extraído se transfirió a un tubo *eppendorf* y se adicionó 100 µL de Elution Buffer; cada extracción se dejó a temperatura ambiente por dos minutos, posteriormente se centrifugó a 5000 g por un minuto y se almacenó a 4°C. Para verificar la integridad del ADN extraído, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TBE 0.5X y se tiñó con bromuro de etidio. La electroforesis corrió a 100 voltios por 45 min en cámara de electroforesis Gel XL ultra V-2 (Labnet International, Inc. Bioscience Research®, Nueva Jersey, EE. UU). El DNA se cuantificó y la pureza fue determinada utilizando el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer y el programa ND-1000 V3.7.1 (Thermo Scientific®, Denver, EE.UU.).

Estandarización de las condiciones de PCR para polimorfismos de ADN amplificadas al azar (RAPDs)

Para la estandarización de la temperatura y concentración de cloruro de magnesio (MgCl₂) se realizaron dos PCR con el control negativo (RBCS+MEM) y 6 Primers OPA1 (*CAGGCCCTTC*), OPA5 (*AGGGG-TCTTG*), OPA7 (*GAAACGGGTG*), OPA8 (*GTGACG-TAGG*), OPA13 (*CAGCACCCAC*) y OPA17 (*GACCGCTTGT*) (Kit A, Operon RAPD 10mer Kit, Cosmo Genetech, Seoul Corea), empleando una master mix primer con temperatura de anillamiento de 37°C, dos concentraciones de MgCl₂ (1,5 y 2,5 mM), Buffer 10X, Taq polimerasa 1 Unit, primer 0,5 µM, dNTPS 200µM. El corrido electroforético se realizó en gel de agarosa al 2.5% en una cámara de electroforesis Gel XL ultra V-2 (Labnet International, Inc. Bioscience Research, Nueva Jersey, EEUU.) por 1 h a 135 voltios.

Polimorfismos de ADN amplificadas al azar (RAPD-PCR)

Se evaluó el daño genotóxico mediante marcadores RAPD-PCR de tipo fenotípico (cualitativo - semi cuantitativo) que amplifican al azar diferentes regiones del genoma. Se utilizaron los primer-oligo nucleótidos OPA 1 y OPA 5 (Kit A, Operon RAPD 10mer Kit, Cosmo Genetech, Seoul Corea) con una *master mix* por primer empleando 5 ng/10 µL de ADN templado con temperaturas de anillamiento de 38 y 39 °C, 2.5 y 3 mM de MgCl₂, buffer 10X, Taq polimerasa 1 Uni-

dad, primer 0,5 μM , dNTPS 200 μM . Se empleó el marcador de peso (Mp) Hyper Ladder 1Kb (Bioline) el corrido electroforético se realizó en gel de agarosa al 2,5% en una cámara de electroforesis Gel XL ultra V-2 (Labnet International, Inc. BioscienceResearch, Nueva Jersey, EEUU.) por 40 minutos a 135 voltios. Para la lectura de los geles se empleó el programa *Gel Analyzer V19.1*, y así visualizar las bandas y estimar el peso molecular; a partir de las bandas generadas se construyó una matriz binaria de presencia (1) y ausencia (0), con la cual se calcularon el porcentaje de polimorfismos $P=(a/n)\times 100$ (a = número de bandas polimórficas detectadas en cada una de las concentraciones de MeHg, n = total de número de bandas en las células no tratadas con MeHg), el índice de estabilidad genética (GST) $GST=(1-a/n)\times 100$ (a = es el número promedio de las bandas polimórficas detectadas en cada una de las concentraciones de MeHg, n = el número de bandas totales en las células no tratadas con MeHg) ⁴, el índice de disimilitud de Jaccard (dJSC) y un dendrograma con los paquetes estadísticos Vegan y StatR para software libre Rwizard V.4.3.

RESULTADOS

Citotoxicidad y CL_{50} . Se observaron valores de viabilidad a las 24 h de incubación de 99.1 al 100% a concentraciones de 0,5, 0,7, 1, 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de MeHg; de 90 % a 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MeHg y de 53 a 57 % a 50 y 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de MeHg. A las 96 h la viabilidad se mantuvo entre el 91.3 al 100% a 0,5, 0,7, 1, y 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de MeHg y se mantuvo de 20 a 0% a 20, 50 y 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de MeHg. (Figura 1). La CL_{50} se determinó en 22,55 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de MeHg con un intervalo de confianza del 95 %.

Anormalidades citológicas: A las 24 h de tratamiento en concentraciones de 0,5, 0,7 y 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de MeHg se observó RBCs sin irregularidades en estruc-

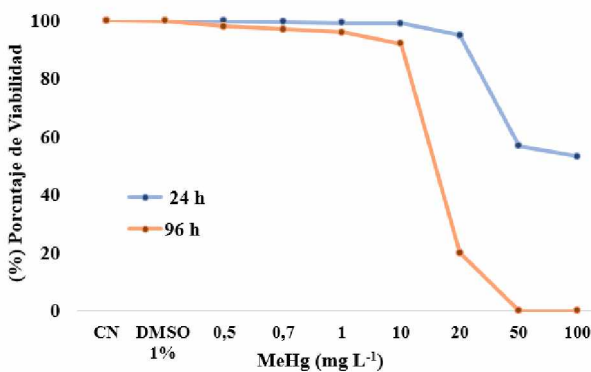


Figura 1. Viabilidad de eritrocitos de la tortuga *Trachemys scripta elegans* sometidos a concentraciones agudas de MeHg, y cuantificados a las 24 y 96 h de tratamiento. Se observa a las 96 h el 100% de mortalidad de los eritrocitos en concentraciones de 50 y 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de MeHg. CN: control negativo, DMSO 1%: control negativo con dimetil sulfóxido al 1% en agua.

tura y forma celular. A las concentraciones de 10, 20, 50 y 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de MeHg se presentan formas de medialuna, inclusiones citoplasmáticas similares a cuerpos de Heinz, desplazamiento de núcleo y destrucción del citoplasma. A las 96 h de tratamiento en concentraciones de 0,5, 0,7, 1 y 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de MeHg se observó desvanecimiento y/o ruptura de la membrana; a diferencia de las concentraciones de 20, 50 y 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de MeHg que predomina la lisis o destrucción celular (Figura 2).

Genotoxicidad. Extracción y cuantificación del ADN. Se obtuvo ADN íntegro sin signos de degradación o fragmentación, con una concentración de 5,4 a 29,8 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y una pureza en DO de 260/280 de 1.7 a 2.0.

Estandarización de las condiciones de PCR para polimorfismos de ADN amplificadas al azar (RAPDs). Se evaluó la amplificación de seis *primers* OPA 1, 5, 7, 8, 13 y 17, con dos concentraciones de MgCl_2 (1,5 y 2,5 mM) a 37°C. De acuerdo a la intensidad y nitidez de las bandas observadas en la electroforesis de los productos de PCR con los 6 *primers* (Figura 3), se seleccionaron para evaluación de los RAPD los *primers* OPA 1 y 5 estableciendo las condiciones para la PCR para cada uno de estos *primers* con las muestras de ADN extraído de RBCs sometidos a las concentraciones de 0,5, 0,7, 1, 10, 20, 50, y 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de MeHg.

Marcadores RAPD-PCR. Los marcadores RAPD-PCR produjeron bandas claras y legibles que permitieron realizar la evaluación de los RBCs sometidos a diferentes concentraciones de MeHg. El polimorfismo se determinó por cuantificación de las *bandas monomórficas y polimórficas*. Se identificaron todas las bandas existentes en el conjunto de muestras y con base en la matriz de presencia y ausencia el primer OPA1 (Figura 4 A1) produjo 14 bandas (2 monomórficas y 12 polimórficas) con un tamaño de 350 a 2000 pb y un polimorfismo de 85%. El OPA5 (Figura 4 B1) produjo 8

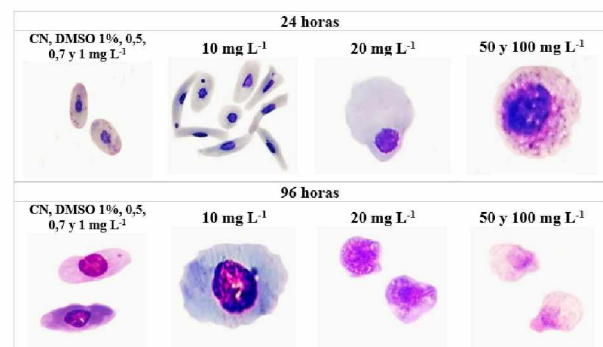


Figura 2. Anormalidades citológicas en RBCs de *Trachemys scripta elegans* post tratamiento a las 24 y 96 h. A las 96 h a 0,5, 0,7, 1 y 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de MeHg se identificó pérdida de la relación de núcleo y citoplasma y desvanecimiento de la membrana. Tinción Giemsa al 20 %, y observación en microscopio de luz 100X.

bandas (4 monomórficas y 4 polimórficas) con tamaños de 300 a 1350 pb y 0% de polimorfismo.

Perfiles electroforéticos de marcadores RAPD-PCR generados a partir del ADN de RBCs de *Trachemys scripta elegans* sometidos *in vitro* a concentraciones agudas de 0,5, 0,7, 1, 10, 20, 50 y 100 mg L⁻¹ de MeHg (Carril 4 - 10) incluyendo el Mp, control negativo y control citotoxicidad (Carril 1 - 3). A: primer OPA 1 que presentó 11 bandas (4 monomórficas y 7 polimórficas) con tamaños entre 400-2000 pb. A1: Interpretación del perfil electroforético de marcadores RAPD-PCR utilizando el primer OPA1. B: OPA5 presentó 8 bandas (4 monomórficas y 4 polimórficas) con tamaños entre 450-1700 pb B2: Interpretación del perfil electroforético de marcadores RAPD-PCR utilizando el primer OPA5.

Se identificó la presencia de una banda para el OPA1 en los RAPDs de DNAs provenientes de las muestras con concentraciones de 0,5, 0,7 y 1 mg·L⁻¹ de MeHg (2 bandas) y en la muestra de concentración de 100 mg·L⁻¹ de MeHg (1 banda). El primer OPA5 presentó una banda en los RAPDs en los DNAs provenientes

de las muestras con concentraciones de 0,5, 0,7, 50 y 100 mg·L⁻¹ (1 banda). Se observaron ausencia de cinco bandas para el primer OPA1 en los DNAs provenientes de las muestras con concentraciones de 0,5 y 0,7 mg·L⁻¹ de MeHg, cuatro bandas para la concentración de 1 mg·L⁻¹ seis bandas para 10 mg·L⁻¹, entre siete y ocho bandas en 20 y 50 mg·L⁻¹ y nueve bandas en 100 mg·L⁻¹ de MeHg. Para el primer OPA5 ausencia de una banda en los RAPDs de las concentraciones de 0,5, 0,7, 1, 10, 20 y 50 mg·L⁻¹, tres bandas en 100 mg·L⁻¹. (Fig.4A1-4B1).

La *estabilidad genética* ($GST=(1-a/n) \times 100$)⁴ establecida con base en el perfil polimórfico de los marcadores RAPDs, frente a los controles con 100 % de GST disminuyó a 64% en las concentraciones de 0,5, 0,7 y 1 mg·L⁻¹ de MeHg, a 57% en 10 mg·L⁻¹ de MeHg, a 50% en 20 y 50 mg·L⁻¹ de MeHg y 42% a 100 mg·L⁻¹ de MeHg.

El *dendrograma* construido con base en la *matriz disimilitud del coeficiente de Jaccard (dJSC)* que mide la disimilitud entre un grupo de datos, es una comparación entre los RBCs tratados y no tratados con MeHg,

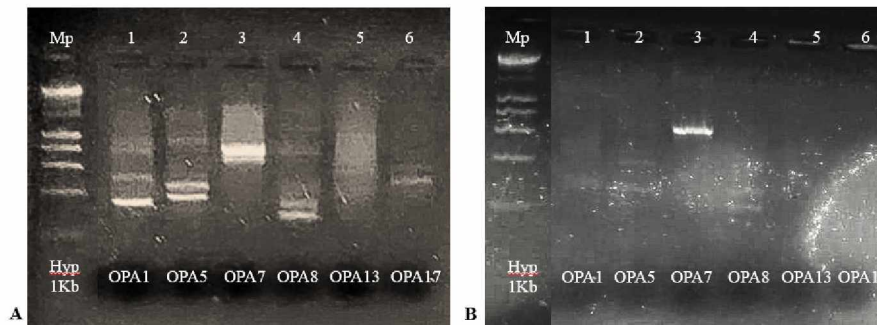


Figura 3. Estandarización de temperatura y concentración de cloruro de magnesio (MgCl₂) para seis *primers* OPA1, OPA5, OPA7, OPA8, OPA13 y OPA17 (Carril 1 - 6) (*Kit A, Operon RAPD 10mer Kit, Cosmo Genetch, Seoul Corea*). A: corrida electroforética de los 6 *primers* a MgCl₂ 1,5 mM. B: Corrida electroforética de los 6 *primers* a MgCl₂ 2,5 mM con temperatura de annea ling de 37°C. El corrido electroforético en gel de agarosa al 2.5% por 1 h a 135 voltios.

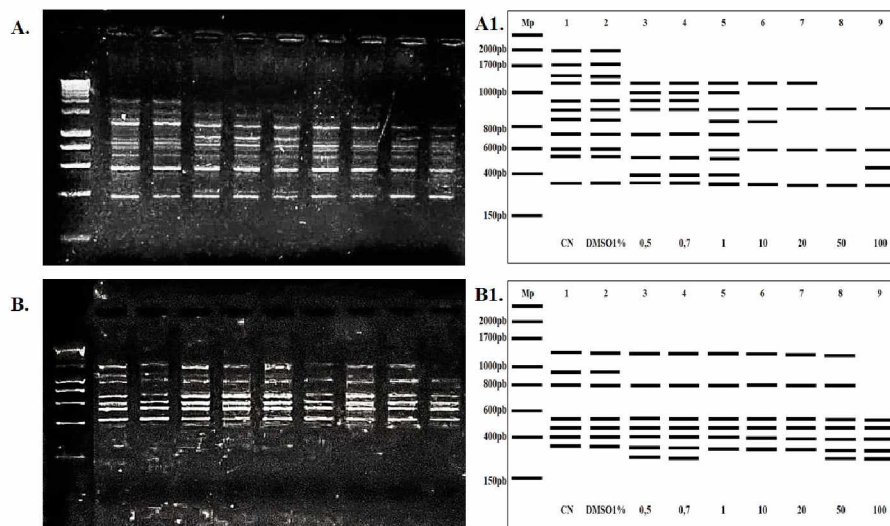


Figura 4. Marcadores RAPDs generados a partir de ADN de RBCs de *Trachemys scripta elegans* sometidos *in vitro* a MeHg (mg·L⁻¹).

Tabla 1. Matriz de disimilitud del coeficiente de Jaccard de RBCs de *Trachemys scripta elegans* sometidos *in vitro* a MeHg. Obtenida con la matriz de presencia y ausencia de bandas producidas por los marcadores RAPD-PCR que muestra la disimilitud entre los controles y los RBCs sometidos *in vitro* a concentraciones agudas de 0,5, 0,7, 1, 10, 20, 50 y 100 mg L⁻¹ de MeHg con una distancia de 0 a 0,63, siendo 50 y 100 mg L⁻¹ las concentraciones de mayor disimilitud.

	CONTROL	DMSO_1	0,5_mgL ⁻¹	0,7_mgL ⁻¹	1_mgL ⁻¹	10_mgL ⁻¹	20_mgL ⁻¹	50_mgL ⁻¹	100_mgL ⁻¹
CONTROL	0								
DMSO_1	0	0							
0,5_mgL ⁻¹	0,47	0,47	0						
0,7_mgL ⁻¹	0,47	0,47	0	0					
1_mgL ⁻¹	0,4	0,4	0,23	0,23	0				
10_mgL ⁻¹	0,35	0,35	0,47	0,47	0,26	0			
20_mgL ⁻¹	0,41	0,41	0,43	0,43	0,33	0,09	0		
50_mgL ⁻¹	0,5	0,5	0,43	0,43	0,43	0,25	0,18	0	
100_mgL ⁻¹	0,63	0,63	0,58	0,58	0,58	0,46	0,41	0,27	0

que muestra distancias desde 0 a 0,64 (Tabla 1) asociados en 4 grupos: A. (Control negativo y control de citotoxicidad (DMSO 1%) (0,0)), B. (0,5, 0,7 y 1 mg·L⁻¹ (0,4-0,47)), C. (10, 20 y 50 mg·L⁻¹ 0,35-0,5)), D. (100 mg·L⁻¹ de MeHg (0,63)). La distancia del grupo B frente al grupo A, es menor que en el grupo C y D por presentar elevado número de polimorfismos, siendo el grupo D el de mayor disimilitud genética (Figura 5).

DISCUSIÓN

En este estudio empleamos concentraciones agudas de MeHg para estresar RBCs de la tortuga *Trachemys scripta elegans*. Los RBCs representan un excelente modelo experimental para estudios de ecotoxicología.

En estudios realizados en RBCs de mamíferos (humanos, ratones y delfines) sometidos a MeHg describen que el metal se ancla a las membranas, ingresa al RBC e interactúa con los grupos sulfhidrilos presentes en residuos de cisteína en la cadena β1 de la hemoglobina. Gracias a esta unión el MeHg alcanza un equilibrio con rapidez en sangre con una relación del 98.1% en RBCs y 1.9% en plasma^{3,18}.

Los RBCs de *Tse* poseen isoformas de hemoglobina con número elevado de residuos de cisteínas (3 residuos por cadena β), lo que le da mayor facilidad al metal de unirse a los enlaces SH, que en condiciones ambientales donde se presentan las formas disueltas del mercurio en altas concentraciones ocasiona que estas tortugas cuando entran en contacto sean más resistentes y lo acumulen en los RBCs^{14,30}.

Lo anterior permite entender el proceso de ingreso y/o interacción de los RBCs sometidos a MeHg durante el estudio. La viabilidad de los RBCs de *Tse* está condicionada por las concentraciones de MeHg (0,5-100 mg·L⁻¹) y el tiempo de exposición. Al determinar la CL₅₀ en 22,55 mg·L⁻¹ de MeHg a 96 h de exposición, se corrobora la disminución en la viabilidad en un 80-100% en concentraciones de 20, 50 y 100 mg·L⁻¹ de MeHg.

En comparación con estudios publicados¹⁵, empleando linfocitos de *Caretta caretta* sometidos a 0,5-1 mg·L⁻¹ de MeHg, reportó viabilidad disminuida frente a concentraciones de 0,1 y 0,35 mg·L⁻¹ de MeHg, arrojando una CL₅₀ de 0,08 mg·L⁻¹ MeHg a las 136 horas.

De otra parte, algunos²⁸ emplearon leucocitos de *Sparus aurata* (Pez dorado) y *Dicentrarch uslabrax* (Pez lubina) obteniendo una CL₅₀ de 2,40 mg·L⁻¹ y 98,5 mg·L⁻¹ de MeHg a las 24 h respectivamente.

Igualmente, otros¹⁰ evaluaron *in vivo* RBCs de *Cyprinus carpio* (Carpa común) y obtuvieron una CL₅₀ de 0,1 mg·L⁻¹ de Hg a 96 h de tratamiento. Según el Decreto 3930 de 2010 para la preservación de flora y fauna se permite hasta 0,01 mg·L⁻¹ de HgT en fuentes hídricas¹⁷, de acuerdo con la CL₅₀ y la viabilidad determinadas para RBCs de *Tse*, la CL₅₀ supera en gran medida las concentraciones límites de los estudios citados anteriormente y las estipuladas en la legislación colombiana.

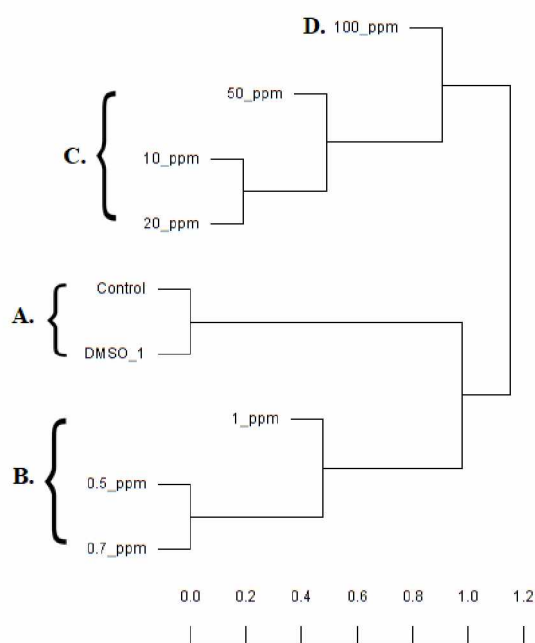


Figura 5. Dendrograma construido con base a la matriz de disimilitud del coeficiente de Jaccard de los RBCs de *Trachemys scripta elegans* sometidos *in vitro* a concentraciones agudas de MeHg, que indican la asociación en 4 grupos: A (control negativo y control de citotoxicidad (DMSO 1%)); B (RBCs con 0,5; 0,7 y 1 mg L⁻¹); C (RBCs con 10, 20 y 50 mg L⁻¹); D (RBCs con 100 mg L⁻¹ de MeHg).

Las anomalías citológicas observadas en los RBCs de *Tse* a las 24 y 96 h a 0,7, 1, 10 mg·L⁻¹ de MeHg como formas de media luna e inclusiones citoplasmáticas semejantes a cuerpos de Heinz (que son la precipitación de hemoglobina inestable), sugieren que pueden ser provocadas por la oxidación de la hemoglobina debido a la acción de la albúmina y el glutatión que reaccionan con el MeHg rompiendo la unión con los grupos SH inhibiendo a la G6PD produciendo metahemoglobina perturbando la distribución intracelular y de la membrana.

El efecto fue observado en estudios realizados³⁶, donde expusieron eritrocitos *in vitro* de ratones y humanos a concentraciones de 0,02 mg·L⁻¹ de MeHg. En la tortuga boba (*Caretta caretta*) se han reportado inclusiones citoplasmáticas con descripciones idénticas a los cuerpos de Heinz humanos (que son la precipitación de hemoglobina inestable), considerando que la hemoglobina de las tortugas es menos estable que la humana, los contaminantes oxidan la hemoglobina generando los cuerpos de inclusión, los RBCs con las inclusiones citoplasmáticas presentaban alteraciones en el tamaño, y forma celular como crenulación de la membrana celular⁵.

Los RBCs de *Tse* sometidos a concentraciones de 20, 50 y 100 mg·L⁻¹ de MeHg a 24 y 96 h presentaron cambios de desplazamiento de núcleo, desvanecimiento y/o ruptura de membrana hasta lisis celular. De acuerdo con algunos investigadores²⁴, el mantenimiento de la forma elipsoidal se afecta por la interacción del MeHg con los grupos SH en los dímeros de tubulina necesarios para el mantenimiento de los microtúbulos presentes en la banda marginal de los RBCs de la tortuga, debido a que el metal promueve la despolimerización a exposiciones bajas y altas^{22,39}.

Las interacciones del ADN con los contaminantes son causadas, al parecer, por inhibición de la síntesis y/o reparación de ADN, por acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) formadas por la acción del MeHg que se une al GSH, agotando el sistema antioxidante, el acoplamiento del MeHg a la guanina y citosina, uniéndose al nitrógeno del grupo amino dando como producto ácido clorhídrico produciendo un mal emparejamiento de las bases y fragmentando el ADN²³.

En ecógeno-toxicología, para detectar la genotoxicidad se emplean los RAPDs por medio de diferencias en los perfiles del ADN de individuos tratados y no tratados con agentes genotóxicos^{13,31,34}. Los marcadores moleculares dominantes RAPD-PCR empleados en este estudio evalúan la presencia, ausencia de bandas y con ello los cambios en el ADN producidos por el xenobiótico al cual las células son expuestas. Los RAPDs requieren de poco material genético, *primers cortos* (10 pb) temperaturas bajas de annealing, alta pureza y baja concentración del ADN^{6,16}.

La estabilidad genética (GST) se relaciona con la extensión del daño del ADN además de la eficiencia en la reparación y replicación del mismo, es decir el alto nivel de daño en el ADN inducido por el tóxico no

disminuye obligatoriamente la GST total, no obstante, los cambios puntuales pueden alterar esta medida³¹. La GST en los RBCs de *Tse* sometidos a concentraciones bajas de MeHg presentaron niveles mayores al 50 %, mientras que a dosis medias se mantiene mayor o igual al 50 % pero a dosis altas es menor al 50 %.

La dJSC mostró una disimilitud entre los controles y las concentraciones de MeHg de 0 a 0,61, indicado en el dendrograma como la distancia entre los grupos A y B, que la disimilitud es menor al comparar concentraciones bajas (0,4 a 0,47), mientras que los grupos C y D presentaron mayor disimilitud (0,5 a 0,63), por su elevado número de polimorfismos, siendo el grupo D con mayor disimilitud genética frente al grupo A. Los resultados presentados no son comparables con otros estudios en la literatura.

Esta investigación es pionera en la determinación *in vitro* de los efectos citotóxicos y genotóxicos producidos por el metil-mercurio en los RBCs de la tortuga *Trachemys scripta elegans*, ya que los estudios encontrados sobre los efectos del mercurio son realizados en células leucocitarias, líneas celulares, tejidos de peces, mamíferos y humanos^{9,12}. La evaluación ecotoxicológica se hace necesaria a través de bioensayos *in vitro* con RBCs y de esta manera evitar métodos invasivos o el sacrificio de los animales para la obtención de muestras.

Las tortugas representan un modelo para estudios de toxicología, son especies centinelas debido a su longevidad y la bio-acumulación y bio-magnificación de los contaminantes ambientales, brindando información del comportamiento de las células *in vivo* frente a exposiciones ambientales^{35,20}.

La simplicidad y la versatilidad en la manipulación de los RBCs junto al limitado volumen de desechos sirven para ejecutar investigaciones futuras de reptiles en eco-toxicología de metales pesados que están presentes hoy en día en el medio ambiente, fomentando planes y proyectos para manejo y conservación de especies.

CONCLUSIONES

Este es el primer estudio que utiliza los RBCs de la tortuga *Trachemys scripta elegans* en la determinación de citotoxicidad y genotoxicidad mostrando que representan un invaluable modelo *in vitro* para estudios de ecotoxicología con MeHg y otros xenobióticos. En el bioensayo la viabilidad de los RBCs de *Trachemys scripta elegans* sometidos a MeHg disminuye más del 50 % a partir de 22.55 mg·L⁻¹ (CL₅₀) a las 96 h de exposición.

A medida que aumenta la concentración de MeHg se observan anomalías citológicas generadas por la citotoxicidad del metal en los RBCs de *Trachemys scripta elegans*. La genotoxicidad evaluada revela elevado porcentaje de polimorfismos, disimilitud y desestabilidad genética significativa en los RBCs a medida que se eleva la concentración de MeHg.

Agradecimientos. A la Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería, al Departamento de Ciencias Biológicas y Ambientales, al Laboratorio de Genética y Biología Molecular y al grupo de investigación GENBIMOL de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Al Instituto de Genética y a la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres de la Universidad Nacional de Colombia.

REFERENCIAS

1. **Agencia Nacional de Minería.** 2020. *Producción de oro en el segundo trimestre de 2020*, Bogotá DC, Colombia.
2. **Agencia para Sustancias Tóxicas** (y Registro de Enfermedades, ATSDR). 2020. *Resumen Salud Pública*, Estados Unidos. <https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/esphs>.
3. **Ancora R, Rossi P, Disimplicio S.** 2002. *In vitro study of methyl mercury in blood of bottlenose dolphins (T. truncatus)*. *Arch Environ Contam & Toxicol* 42: 3, 348-353.
4. **Atienzar F, Jha A.** 2020. The randomized amplified polymorphic DNA assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 613: 2-3, 76-102.
5. **Basile F et al.** 2011. The bodies of inclusion in erythrocytes the *Boba turtle* is associated with unstable hemoglobin and resemble the human Heinz bodies. *Journal of Experim Zool* 315^a: 7, 416-423.
6. **Becerril MC.** 2002. Incidencia de los contaminantes ambientales genotóxicos en células de trucha arcoiris. *Universidad Complutense de Madrid* 42: 3, 348-353.
7. **Becker P.** 2020. Egg mercury levels decline with laying sequence in Charadriiformes. *Bull Environ Contam Toxicol* 48: 5, 762-767.
8. **Bergeron C, Husak J, Unrine J, Romanek C, Hopkins W.** 2018. Influence of feeding ecology on blood mercury concentrations in four species of turtles. *Environmental and Chemical Toxicology* 26: 8: 1733-1741.
9. **Berntsen M, Aatland A, Handy R.** 2003. Chronic exposure to mercury in the diet causes oxidative stress, brain injuries and altered behavior in Atlantic salmon (*Salmon salar parr*). *Aquatic Toxicology Internet Journal* 65: 1, 55-72.
10. **Betancourt N, Martínez G, Medina G, Oliván L.** 2008. Daño genotóxico y citotóxico producido por mercurio sobre células sanguíneas de *Cyprinus carpio*. *Ameqa & Setac* p. 1-7.
11. **Burger J.** 1994. Heavy metals in avian eggshells: another excretion method. *J Toxicol Environ Health* 41: 2, 207-220.
12. **Castoldi A, Coccini T, Ceccatelli S, Manzo L.** 2018. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Resear Bull [Internet Journal]* 55: 2, 197-203.
13. **Cenkci S, Yldz M, Cigerci H, Konuk M, Bozdog A.** 2009. Toxic chemicals induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris L.*) seedlings. *Chemosphere Intern Magaz* 76: 7, 900-906.
14. **Damsgaard C, Storz J, Hoffmann F, Phage A.** 2013. Differentiation of hemoglobin isoforms and allosteric regulation of oxygen binding in the tortoise, *Trachemys scripta*. *Am J Physiol Regulat Integr & Comp Physiol* 305: 8, R961-R967.
15. **Day R, Segars A, Arendt M, Lee A, Peden M.** 2007. Ratio of blood mercury levels to health parameters in the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Environm Health Perspect Internet Journal* 115: 10, 1421-1428.
16. **Dewolf H.** 2004. The use of RAPD in ecotoxicology. *Investig of mutat revis [Internet Journal]* 566: 3, 249-262.
17. **Díaz F.** 2015. Mercurio en la minería del oro: impacto en las fuentes hídricas destinadas para consumo humano. *Rev Salud Públ* 16: 6, 947-957.
18. **Doi R, Tagawa M.** 1983. A study on the biochemical and biological behavior of methyl mercury. *Toxicology and Applied Pharmacology* 69: 3, 407-416.
19. **Gaona X.** 2004. El mercurio como contaminante global: desarrollo de metodologías para su determinación en suelos contaminados y estrategias para la reducción de su liberación al medio ambiente. *Univ Autón de Barcelona, Dept. Química, Barcelona, España* p. 10-25.
20. **González Y, Albear E, Garrido N, Sánchez D, Pérez G.** 2012. Aplicación de un bioensayo ecotoxicológico en la evaluación de una mezcla compleja ambiental. *Hig Sanid Ambient* 12: 1, 839-845.
21. **Guisande C et al.** 2015. Factor R: Rwizard application for identifying the most like causal factors in controlling species richness. *Intern Journ* 7: 385-396.
22. **Imura N, Miura K, Inokawa M, Nakada S.** 1980. Mechanism of methyl mercury cytotoxicity: by biochemical and morphological experiments using cultured cell. *Toxicology* 17: 2, 241-254.
23. **Karouna N, White C, Perkins C, Schmerfeld J, Yates D.** 2014. Assessment of mitochondrial DNA damage in little brown bats (*Myotis lucifugus*) collected near a mercury-contaminated river. *Ecotoxicology* 23: 8, 1479-1489.
24. **Lee K, Kerr L, Cohen W.** 2007. Molecular organization and *in vivo* function of amphibian erythrocyte cytoskeleton. *Cell Motil & Cytoskelet* 64: 8, 621-628.
25. **Lewis S, Furness R.** 1993. The role of eggs in mercury excretion by quail *Coturnix coturnix* and the implications for monitoring mercury pollution by analysis of feathers. *Ecotoxicology* 2: 1, 55-64.
26. **Luna M, Soto E.** 2016. Consideraciones ambientales por el uso de mercurio en minería aurífera en el municipio de *El Bagre, Antioquia*: estrategias de producción limpia. *Univ de Córdoba, Montería, Colombia*, p.14-17.
27. **Min Energías U. Córdoba.** 2014. Estudio de la cadena del mercurio en Colombia con énfasis en la actividad minería de oro. *Tomo 3, Capítulo 6*, p. 56-69.
28. **Morcillo P, Meseguer J, Esteban M, Cuesta A.** 2016. *In vitro* effects of metals on isolated head-kidney and blood leucocytes of teleost fish *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology* 54: 77-85.
29. **Özlem S.** 2017. *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages and disadvantages. *Intech Open Chapter I [Book]* DOI: 10.5772.
30. **Petersen A et al.** 2018. Haemoglobin polymerization by forming disulfide bonds in the hypoxia-tolerant trachemys scripta tortoise: implications for antioxidant defense and

- O₂ transport. *American Journal of Physiology-Regulatory* 314: 1, R84-R93.
31. **Rocco L, Valentino I, Scapigliati G, Stingo V.** 2013. RAPD-PCR analysis for molecular characterization and genotoxic studies of a new cell line of marine fish derived from *Dicentrarchus labrax*. *Cytotechnology* 66: 3, 383-393.
 32. **Rojas S et al.** 2000. Protocolo para el manejo y disposición de tortugas icoteas (*Trachemys scripta*) en el centro de recepción y rehabilitación de fauna silvestre de Engativá, Bogotá, Colombia, p. 2-26.
 33. **Sánchez S.** 2005. Distribución de bacterias sulfato reductoras y metil mercurio en sedimentos de lagunas de inundación del río Beni, Amazonía Boliviana. *Univ. Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia*, p.12, 48.
 34. **Sarkar T, Vijay K, Reddy P.** 2010. Effect of nickel on regeneration in *Jatropha curcas L.* and assessment of genotoxicity using RAPD markers. *BioMetals* [Internet Journal] 23: 1149-1158.
 35. **Stardler T.** 1999. Bioensayos de laboratorio para la evaluación ecotoxicológica de productos fitosanitarios. *Rev Soc Entomol Argent* 58: 1-2, 249-254.
 36. **Tanaka R, Nakai K.** 1977. Hemolysis and morphological changes in rat erythrocytes with mercurials. *The Japanese Journal of Pharmacology* 27: 3, 413-419.
 37. **Valencia B, Zapata L, Bock B, Páez V, Palacio J.** 2014. Niveles de mercurio en huevos, embriones y neonatos de *Trachemys callirostris* (Testudines, Emydidae). *Acta Biológica Colombiana* 10: 3, 499.
 38. **Vargas S, Negrete J.** 2019. Mercurio, metil-mercurio y otros metales en peces de Colombia: riesgo por ingesta. *Acta Biológica Colombiana* 24: 2, 232.
 39. **Vogel D, Margolis R, Mottet N.** 1985. The effects of methyl mercury binding to microtubules. *Toxicology and Applied Pharmacology* 80: 3, 473-486.
 40. **Wolfe M, Schwarzbach S, Sulaiman R.** 1998. Effects of mercury on wildlife: a comprehensive review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 2, 146.
 41. **White J, Rothstein A.** 2018. The interaction of methyl mercury with erythrocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 26: 3, 370-384.



SCImago
Journal & Country
Rank



Revista Veterinaria mantiene su índice de impacto

Noticias de Scimago Research Group (Scimago Journals & Country Ranks, Scopus-Elsevier) comunican que la publicación de nuestra casa, Revista Veterinaria, aumentó su índice de impacto. El índice SJR mide la influencia científica (impacto) del artículo de una revista, expresando cuán importante es el “artículo promedio” de la publicación en la discusión científica global (sistema Thomson Reuters).

Para nuestra revista, tal indicador había sido de 0,03 entre 2008 y 2011, aumentando a 0,05 en 2012, a 0,11 en 2013, a 0,108 en 2015, a 0,100 en 2017 y a 0,114 (Research Gate) en 2018, último período evaluado. Asimismo, surge para nuestra publicación un sostenido descenso del indicador que relaciona “citas versus autocitas”, demostrando que los autores de los artículos están abandonando la práctica de citar sus propias publicaciones anteriores.

Por último, se advierte que según este portal, nuestra “Revista Veterinaria” continúa siendo la única publicación de esta rama de la ciencia que posee índice de impacto en Argentina. Para el resto del cono sur tal distinción recae en Brasil, Chile, Colombia y Venezuela. En revistas de veterinaria, a nivel mundial el mayor índice de impacto (2,911 puntos) recae en Annual Review of Animal Biosciences (Estados Unidos).

Fuente:

<http://www.scimagojr.com/journalrank.php?area>
Retrieved September, 2019.