

Anormalidades morfológicas nucleares en hematías del pez *Prochilodus linneatus* expuesto al clorpirifos

Caramello, C.S.¹; Cowper, C.F.¹; Jorge, M.J.²; Pérez, J.E.¹; Jorge, L.C.¹

¹Fac. Cs. Veterinarias, ²Fac. Cs. Exactas, Universidad Nac. del Nordeste, Cabral 2139, Corrientes, Argentina. E-mail: ccaramello@vet.unne.edu.ar

Resumen

Caramello, C.S.; Cowper, C.F.; Jorge, M.J.; Pérez, J.E.; Jorge, L.C.: Anormalidades morfológicas nucleares en hematías del pez *Prochilodus linneatus* expuesto al clorpirifos. *Rev. Vet.* 30: 2, XX-XX, 2019. Recientemente adquirió importancia el monitoreo de xenobióticos (como pesticidas) en el medio ambiente, debido a la persistencia de la actividad biológica de muchos de ellos. Clorpirifos es un insecticida organofosforado empleado a nivel agrícola y doméstico. Este plaguicida puede alcanzar accidentalmente el ecosistema acuático y la fauna íctica. Al ingerir sustancias contaminadas, los peces desarrollan alteraciones debidas a la bioacumulación, constituyéndose en eficaces indicadores de contaminación ambiental. El propósito del estudio fue evaluar la genotoxicidad del clorpirifos en *P. linneatus* (Pisces, Prochilodontidae) a través de la frecuencia de micronúcleos (MN) y de alteraciones de la morfología nuclear (AMN) en eritrocitos de sangre periférica. Los ensayos se realizaron con clorpirifos en su forma pura (Sigma Aldrich). Los peces se dividieron en grupos control (C) y tratados (T1 = 10 µg/l; T2 = 30 µg/l y T3 = 90 µg/l). Se realizaron tres replicas por grupo, con un total de 3 animales por pecera, los cuales permanecieron allí durante 7 días, tras lo cual fueron sacrificados con sobredosis de anestésico. Se extrajo sangre de la vena caudal, realizándose frotis que se colorearon con Giemsa, determinándose el número de MN y AMN luego de la observación de 2000 células por animal. Para el estudio se consideraron las células con sus membranas citoplasmáticas intactas. En ambos grupos, los frotis sanguíneos revelaron la presencia de micronúcleos, así como algunas de las siguientes alteraciones de la morfología nuclear: muesca, lobulación, evaginación, forma de ocho, segmentación y vacuolización nuclear. Los individuos del grupo T3 mostraron variaciones significativas en la frecuencia de MN y AMN respecto a los controles (p<0,05), no así los ejemplares de los tratamientos T1 y T2. Por lo expuesto, surge que el clorpirifos a la dosis de 90 µg/l podría ser nocivo para el medio ambiente.

Palabras clave: pez, *Prochilodus linneatus*, clorpirifos, hematías, anormalidades, micronúcleos.

Recibido: abril 2019 / Aceptado: julio 2019

Abstract

Caramello, C.S.; Cowper, C.F.; Jorge, M.J.; Pérez, J.E.; Jorge, L.C.: Morphological abnormalities in nucleus of hemocytes from the fish *Prochilodus linneatus* exposed to clorpirifos. *Rev. Vet.* 30: 2, XX-XX, 2019. In recent years, the monitoring of xenobiotics (chemicals such as pesticides) in the environment has been very important, as the persistence of the biological activity of many of these compounds has been rec-

ognized. Chlorpyrifos is an organophosphorus insecticide of broad spectrum, used in agricultural and domestic activities. This pesticide as well as other chemicals may accidentally reach the aquatic ecosystem and the ictic fauna. Fish ingesting contaminated substances subsequently develop alterations due to bioaccumulation, becoming effective indicators of environmental pollution. The purpose of this study was to evaluate the genotoxicity of chlorpyrifos in *P. linneatus* (Pisces, Prochilodontidae) through the frequency of *micronuclei* (MN) and *nuclear morphology alterations* (AMN) in peripheral blood erythrocytes. After acclimatization the fish were divided into two control (C) and treated groups (T1 = 10 µg/l, T2 = 30 µg/l and T3 = 90 µg/l). Three replicates per group (C, T) were performed with a total of 3 animals per fishbowl. The animals remained in the aquariums for a period of 7 days. After this time they were sacrificed with an overdose of anaesthetic to extract blood from the caudal vein. Smears were stained with Giemsa. In the samples analyzed, the number of MN and AMN was determined after observation of 2000 cells per animal. Cells with intact cytoplasmic membrane were considered for the study. The analysis of blood smears in both groups revealed the presence of micronuclei and the following nuclear morphology alterations; notches, lobulated, evaginations, eighth shaped, segmentations and vacuolization nuclei. Individuals T3 showed significant variations in the frequency of MN and AMN with respect to the controls ($p < 0.05$), but not the T1 and T2 specimens. We conclude that chlorpyrifos at a dose of 90 µg/l could be harmful to the environment.

Key words: fish, *Prochilodus linneatus*, chlorpyrifos, erythrocytes, abnormalities, micronucleus.

INTRODUCCIÓN

Clorpirifos es un insecticida organofosforado, clasificado entre los productos de clase II (moderadamente peligroso). Según la nomenclatura IUPAC su nombre es 0,0-dietil 0-(3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato) y su fórmula empírica es $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ ¹⁹. Al combinarse con la acetilcolinesterasa inhibe su acción enzimática, por lo cual la acetil colina no se libera del sitio receptor y el mensaje del impulso continúa pasando en las terminales nerviosas del insecto³.

Es empleado como insecticida en cultivos de granos, algodón, frutas, nueces y hortalizas, así como en césped y plantas ornamentales. También está registrado para su uso directo en varias especies animales (caballos, ovejas, perros y otros). El clorpirifos actúa sobre las plagas principalmente como un veneno de contacto⁹.

En seres humanos y animales, el clorpirifos puede introducirse por vía digestiva, pulmonar y cutánea. La exposición por poco tiempo a niveles bajos (miligramos) puede causar mareo, fatiga, secreción nasal, lagrimeo, salivación, náusea, molestia intestinal, sudor y cambios en el ritmo cardíaco. A niveles más altos, la exposición oral de corta duración puede provocar parálisis, convulsiones, desmayos y muerte.

Semanas después de la desaparición de los síntomas originales, puede causar debilidad muscular. Otras consecuencias incluyen cambios de conducta o hábitos de sueño, trastornos de humor y efectos en el sistema nervioso, así como en los músculos de las extremidades⁴.

Este insecticida se dispersa en el aire y en aguas superficiales, acumulándose en diferentes organismos acuáticos, especialmente en los peces, que son vulnerables a los efectos perjudiciales del compuesto.

En teleósteos, las investigaciones sobre las consecuencias provocadas por exposición a pesticidas adquieren gran relevancia ya que los resultados obtenidos se pueden emplear para predecir probables mecanismos de toxicidad en seres humanos. Además, los peces han demostrado ser modelos experimentales útiles para la evaluación del estado de los ecosistemas acuáticos expuestos a la contaminación ambiental⁸.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la genotoxicidad del clorpirifos en *Prochilodus linneatus* (Pisces, Prochilodontidae) a través de la frecuencia de *micronúcleos* (MN) y de *alteraciones de la morfología nuclear* (AMN) en eritrocitos de sangre periférica, después de una exposición crónica al insecticida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales. Ejemplares juveniles de *P. linneatus* con $18,2 \pm 3,2$ g y $11 \pm 1,8$ cm (media \pm DE, n = 36), fueron proporcionados por el Instituto de Ictiología del Nordeste (INICNE, Corrientes, Argentina). Antes de las pruebas de toxicidad, los especímenes fueron aclimatados a las condiciones de laboratorio por un lapso de 15 días, permaneciendo en tanques de 300 litros de agua de clorinada a 20°C, pH 7.0 y un fotoperíodo ajustado de 12 h de oscuridad y 12 h de luz. Durante esta etapa los especímenes fueron alimentados cada 48 h y se efectuaron controles periódicos de su estado sanitario.

Producto químico. Se empleó clorpirifos (0,0-dietil 0-[3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato]) en su forma pura (99,9%), Sigma Aldrich N° CAS 2921-88-2.

Experimento de exposición in vivo. Los peces se dividieron en dos grupos: control (C = mantenidos en agua de pozo artesiano) y tratados con clorpirifos (T1 = 10 μ g/l; T2 = 30 μ g/l y T3 = 90 μ g/l). Se efectuaron tres réplicas por grupo (3 individuos por pecera). Las peceras poseían 10 litros de capacidad para el bienestar de los peces y el mejor equilibrio de los acuarios (se empleó el cálculo de un litro de agua por cada centímetro de pez). Para la elección de las dosis se tomaron como referencia los valores establecidos en los niveles guía para la calidad de agua potable: 30 μ g/l (Organización Mundial de la Salud, OMS) y 90 μ g/l (Decreto 831/1993 reglamentario de la Ley 24.051 sobre régimen de desechos peligrosos, República Argentina). De esta manera el ensayo contempló las dos dosis referenciadas y una tercera de menor concentración.

Sacrificio. Los animales permanecieron en los acuarios durante un lapso de 7 días. Este periodo es inferior al tiempo necesario para la degradación del insecticida en agua, estimado en 29 días en condiciones controladas del laboratorio. Culminada la etapa de exposición, los ejemplares fueron sacrificados con sobredosis de *clorhidrato de lidocaína*. Para el ensayo de micronúcleos las muestras de sangre se obtuvieron del pez por punción de la vena caudal, utilizando una jeringa heparinizada.

Ensayo de micronúcleos. Inmediatamente después de la extracción de sangre, se colocó una gota sobre un portaobjeto para la realización de los frotis. Éstos se fijaron en etanol durante 10 min y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente; luego se tiñeron con Giemsa al 5% en tampón Sörenson (pH 6,9) durante 20 minutos. Se examinaron un total de 2000 eritrocitos de cada individuo. Las microfotografías fueron tomadas con microscopio Olympus BX41 provista de cámara digital Motic 9.0. En las muestras analizadas se determinó la cantidad de *micronúcleos* (MN) y el número de *alteraciones*

morfológicas nucleares (AMN). Los criterios para la identificación de *MN* y *AMN* fueron los establecidos para los test de micronúcleos en peces⁷. Las frecuencias de *MN* y *AMN* se obtuvieron según el siguiente cálculo:

$$\text{MN y AMN \%} = \frac{\text{número de células que contienen MN y AMN}}{\text{número total de células contadas}} \times 100$$

Análisis estadísticos: los cálculos incluyeron media aritmética y desvío estándar, efectuándose asimismo el test t de Student. Se realizó además, un análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron 36 ejemplares de *P. linneatus*. En cada uno de ellos se examinaron 2.000 eritrocitos, resultando un total de 72.000 células contadas. Se observaron células con *MN*, muescas, lobulaciones, evaginaciones, núcleos en forma de ocho, núcleos segmentados y núcleos con vacuola (Figura 1).

Las frecuencias de *MN* y *AMN* para los diferentes grupos fueron: control = 0,13%; T1 = 0,29%, T2 = 0,37% y T3 = 0,88% (Tabla 1). El análisis estadístico reveló que hubo diferencias significativas entre las dosis 10 µg/l y 90 µg/l (p<0,005) y entre las dosis 30 µg/l y 90 µg/l (p<0,005), mientras las dosis 10 µg/l y 30 µg/l no mostraron diferencias entre ambas, ni tampoco con el grupo control (Figura 2).

No se encontraron trabajos que emplearan clorpirifos en su formulación pura. Con relación al efecto genotóxico de formulaciones comerciales a base de clorpirifos en peces, existen estudios realizados en especímenes de agua dulce. Experiencias en ejemplares de *Channa punctatus* expuestos a las concentraciones de 203, 406 y 609 µg/l de clorpirifos (*Tricel*) revelaron que la concentración más baja del tratamiento indujo en eritrocitos una frecuencia de *MN* a las 24 h de 0,070%, viéndose aumentado significativamente a 0,875% después de 96 h de exposición.

Una tendencia similar se observó para la segunda concentración, en la cual la frecuencia de *MN* de 0,134% en 24 h aumentó a 0,964% después de 96 h. Sin embargo, en la concentración más alta, la inducción de *MN* fue menor comparada con los demás tratamientos¹.

Especímenes de *Channa punctatus* se utilizaron en ensayos crónicos (35 días), empleando dosis de 203, 102 y 68 µg/l del pesticida; el análisis mostró que el clorpirifos de grado técnico (*Tricel*) es genotóxico para los peces, incluso a una concentración 68 µg/l, siendo ello indicativo de los potenciales peligros del plaguicida para los organismos acuáticos².

De igual manera, los peces de agua dulce de la especie *Channa punctatus* expuestos a las concentraciones de 10, 5, 2,5 y 1 µ/l de clorpirifos evidenciaron después de 25 días una mayor frecuencia de eritrocitos con *MN* y anomalías nucleares en comparación con los individuos controles.

La frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares en los eritrocitos periféricos aumentó progresivamente con el incremento del período de exposición y/o concentración del insecticida¹⁴. Otros estudios realizados con ejemplares de *Cirrhinus mrigala* expuestos durante 35 días a las dosis de 0,02, 0,04 y 0,08 mg/l de clorpirifos, revelaron que todos los grupos tratados tuvieron una mayor frecuencia de eritrocitos con *MN* y anomalías nucleares, en comparación con el control.

El incremento en la frecuencia de MN fue dependiente de la dosis empleada y de la duración del tratamiento. A lo largo del período experimental, la inducción de MN y su frecuencia fueron significativamente mayores en la dosis de 0,08 mg/l en comparación con los tratamientos de 0,02, 0,04 y control⁵.

Ensayos efectuados con una formulación comercial (*Pyrinex*) a base de clorpirifos en *Poecilia reticulata* por un período de 96 h y a las concentraciones de 0; 0,005; 0,01; 0,015; 0,020 y 0,025 mg/l revelaron la aparición de micronúcleos y otras anomalías nucleares en todos los tratamientos y controles, siendo su frecuencia dependiente de la concentración de clorpirifos y de la temperatura, registrándose mayores alteraciones (MN y AMN) en coincidencia con la mayor temperatura (30°C) y concentración (0,025 mg/l)²¹.

Por otro lado, se realizaron ensayos de laboratorio con ejemplares marinos. Así, *Chanos chanos* puestos en contacto con clorpirifos a la dosis de 1,38; 2,15; 4,53; 9,27 y 18,79 µg/l mostraron una respuesta clastogénica (formación de micronúcleos) al aumentar las concentraciones de pesticidas¹⁸.

Del mismo modo, en *Oreochromis mossambicus* sometidos a la acción del insecticida durante 48 h a las concentraciones de 0,0001; 0,0002; 0,0003; 0,001 y 0,01 ppm se observó un aumento en la frecuencia de MN en los individuos tratados en comparación con los del grupo control, siendo esta especie considerada muy resistente, por lo tanto cualquier efecto de los pesticidas indicaría un impacto mayor en otras especies susceptibles¹⁷.

La detección del impacto de xenobióticos es de gran importancia para la evaluación de la citotoxicidad de los mismos, ya que el potencial genotóxico suele estar implicado en toxicidades carcinógenas y reproductivas como un factor de riesgo primario. Las pruebas de genética toxicológica son útiles ya que permiten describir la capacidad de diferentes compuestos para dañar la información genética celular y para inducir mutaciones¹⁰.

Los glóbulos rojos son un valioso modelo *in vitro* para evaluar la citotoxicidad de diferentes moléculas naturales o sintéticas, y orgánicas o inorgánicas mediante medidas de daño celular¹⁰. El test de MN es una prueba muy utilizada como marcador de efecto genotóxico de diferentes contaminantes en los estudios de monitoreo biológico para evaluar su potencial citogenotóxico a campo y en condiciones de laboratorio. La aparición de micronúcleos en una célula indica la presencia de aberraciones cromosómicas durante la mitosis¹¹.

Por otro lado, las anomalías morfológicas nucleares han sido observadas en eritrocitos como consecuencia de contaminantes ambientales y químicos con acciones citotóxicas y mutagénicas. Los mecanismos de su formación no han sido totalmente explicados. Sin embargo, son considerados como indicadores de daño genotóxico, completando así los resultados de los conteos de micronúcleos en ensayos de rutina¹².

Una probable explicación sobre el daño en el material genético de *P. linneatus* puede deberse al potencial del clorpirifos para ocasionar anomalías inmunológicas, daño tisular y producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), además de la consecuente inducción de estrés oxidativo¹³.

Todos los organismos están expuestos a EROs, los cuales pueden ocasionar daño en el ADN, sin embargo en condiciones normales existe un eficiente sistema de enzimas detoxificantes y de reparación de ADN que mantienen el equilibrio de la oxidoreducción⁶. Por otro lado, cuando la concentración de las especies reactivas de oxígeno

está crónicamente aumentada, se produce estrés oxidativo, perturbando así el metabolismo celular, su regulación y sus constituyentes¹⁶.

Los organofosforados como el clorpirifos, pueden producir estrés oxidativo a través de varios mecanismos, así como ruptura de las señales neuronales y endocrinas, ocasionando un incremento en el influjo intracelular de Ca²⁺, desencadenando la activación de enzimas proteolíticas, y la generación de radicales libres.

Si bien, las EROs regulan varios procesos biológicos mediante vías de transducción, niveles altos y/o sostenidos de estas sustancias desencadenan estrés oxidativos que podrían causar daño severo al ADN, proteínas y lípidos, generando disfunciones y culminando en la muerte celular^{15,20}.

En conclusión, los resultados obtenidos permiten deducir que el clorpirifos puro a la dosis de 90 µg/l genera la aparición de alteraciones en el núcleo de eritrocitos de *P. linneatus*, lo cual podría indicar su potencial efecto nocivo para el medio ambiente.

REFERENCIAS

1. **Ali D, Nagpure NS, Kumar S, Kumar R, Kushwaha B.** 2008. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Chemosphere* 71: 1823-1831.
2. **Ali D et al.** 2009. Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food & Chem Toxicol* 47: 650-656.
3. **Amitai G, Moorad D, Adani R, Doctor BP.** 1998. Inhibition of acetyl cholinesterase and butyryl cholinesterase by chlorpyrifos-oxon. *Biochem Pharm* 56: 293-299.
4. **ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.** 1997. *Chlorpyrifos*. Disponible en: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs84.html.
5. **Bhatnagar A, Yadav AS, Cheema N.** 2016. Genotoxic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Cirrhinus mrigala* using micronucleus assay. *Adv Biol*, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9276963>. Article ID 9276963, 6 pages.
6. **Buschini A, Carboni P, Martino A, Poli P, Rossi C.** 2003. Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. *Mutat Res Genet Toxicol & Environm Mutagenesis* 537: 81-92.
7. **Carrasco KR, Tilbury KL, Myers MS.** 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an *in-situ* biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian J Fisher & Aquat Sci* 47: 2123-2136.
8. **Deb N, Das S.** 2013. Chlorpyrifos toxicity in fish: a review. *Current World Environ* 8: 77-84.
9. **Extension Toxicology Network (Exttoxnet).** 1996. *Pesticide information profiles*. In: <http://exttoxnet.orst.edu/pips/chlorpyr.htm>.
10. **Farag MR, Alagawany M.** 2018. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. *Chem Biol Interact* 279: 73-83.
11. **Fenech M et al.** 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagen* 26: 125-132.
12. **Gökalp FD, Güner U.** 2011. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyre-

- throid insecticide lambda-cyhalothrin. *Mutat Res Genet Toxicol & Environ Mutagen* 726: 104-108.
13. **Gupta SC et al.** 2010. Chlorpyrifos induces apoptosis and DNA damage in *Drosophila* through generation of reactive oxygen species. *Ecotoxicol & Environment Safety* 73: 1415-1423.
 14. **Kumar SP.** 2012. Micronucleus assay: a sensitive indicator for aquatic pollution. *Internat J Res BioSci* 1: 32-37.
 15. **Lau AT, Wang Y, Chiu JF.** 2008. Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. *J Cell Biochem* 104: 657-667.
 16. **Lushchak V.** 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 101: 13-30.
 17. **Naqvi GZ, Shoaib N, Ali AM.** 2016. Genotoxic potential of pesticides in the peripheral blood erythrocytes of fish (*Oreochromis mossambicus*). *Pakist J Zool* 48: 1643-1648.
 18. **Palanikumar L, Kumaraguru AK, Ramakritinan CM, Anand M.** 2014. Toxicity, biochemical and clastogenic response of chlorpyrifos and carbendazim in milkfish *Chanos chanos*. *Internat J Environ Sci & Technol* 11: 765-774
 19. **Smegal DC.** 2000. Human health risk assessment: chlorpyrifos. U.S. *Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Washington, USA*. 131 p.
 20. **Sunanda M et al.** 2016. Effects of chlorpyrifos (an organophosphate pesticide) in fish. *Internat J Pharm Sci Review & Research* 39: 299-305.
 21. **Tapia FJ.** 2017. Interacción de temperatura y clorpirifos (Pyrinex®) sobre la estabilidad genética de *Poecilia reticulata* ("Gupi"). *Tesis para optar al título profesional de Biólogo*, Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima, Perú. 83 p.

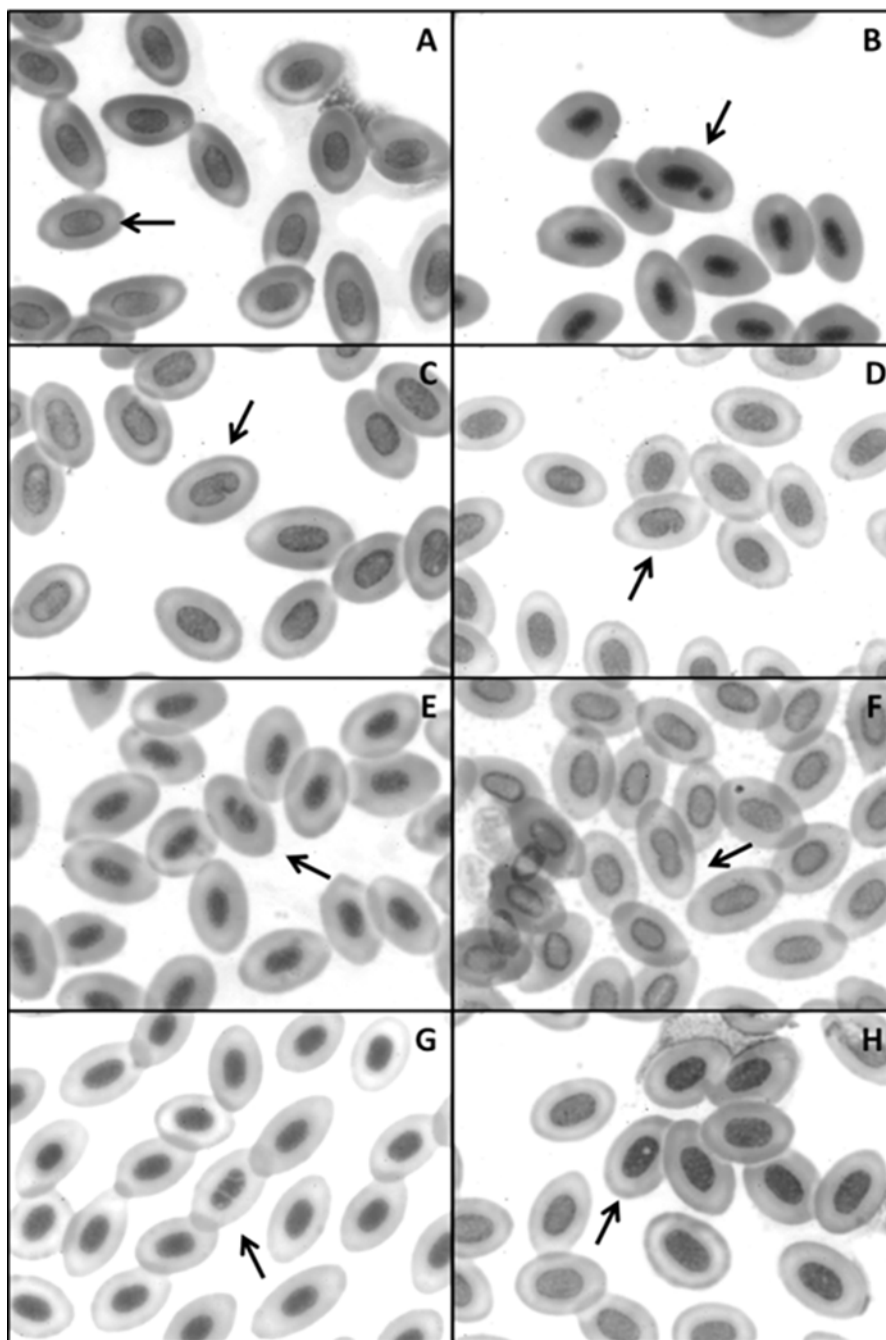


Figura 1. Fotomicrografía de frotis sanguíneos de *P. linneatus*, **a:** eritrocitos con núcleos normales; **b:** micronúcleo; **c:** muesca; **d:** lobulación; **e:** evaginación; **f:** forma de ocho; **g:** segmentado; **h:** vacuolas.

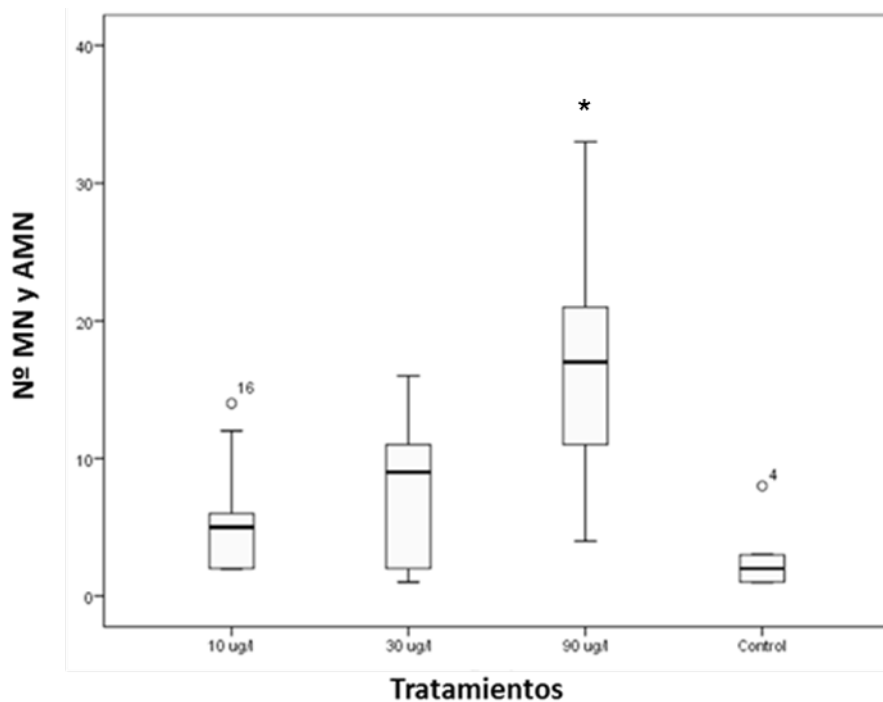


Figura 2. Box plot mostrando el número de micronucleos (*MN*) y anomalías morfológicas nucleares (*AMN*) en los diferentes tratamientos en *P. linneatus* después del periodo de exposición (7 días). Se observan diferencias significativas en la dosis de 90 $\mu\text{g/l}$ (* $p < 0,05$).

Tabla 1. Porcentaje de eritrocitos con morfología nuclear normal y alterada según tratamientos. *MN*: número de micronucleos, *AMN*: anomalías morfológicas nucleares.

concentracion del clorpirifos en agua	% de eritrocitos sin MN y AMN	% de eritrocitos con MN y AMN
no contiene (control)	99,87	0,13
10 $\mu\text{g/l}$ (T1)	99,71	0,29
30 $\mu\text{g/l}$ (T2)	99,63	0,37
90 $\mu\text{g/l}$ (T3)	99,12	0,88