

USO DE PRUEBAS HEMATICAS PARA DETECCIÓN DE CONTAMINANTES AMBIENTALES EN AVES

USE OF LIVER TESTS FOR DETECTION OF ENVIRONMENTAL CONTAMINANTS IN BIRDS

¹Amara Sahad Jiménez Chávez, ²Guadalupe Javier Jiménez Santillán

¹Maestra en Ciencias. Instituto de Ecología, A.C., Red de Ecología Funcional. iberisblack@gmail.com 3221807450. Carretera antigua a Coatepec 351, Col. El Haya, Xalapa, Veracruz. CP 91073.

²Maestro en Ciencias. Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Querétaro, Departamento de Ciencias Económico-Administrativas. guadalupe.js@queretaro.tecnm.mx 4422344178. Av Tecnológico S/N, Centro Histórico, Centro, 76000 Santiago de Querétaro, Qro.

Resumen

Las poblaciones de aves silvestres disminuyen por diversos factores ambientales. Uno de ellos es la contaminación ambiental, especialmente causadas por plaguicidas y otros genotóxicos que son empleados en diversas actividades agropecuarias y agroindustriales, así como prácticas antrópicas, las cuales son fuentes importantes de contaminación que afectan el suelo, agua y aire.

Contaminantes como los genotóxicos, además de causar modificaciones genéticas, afectan diversas funciones metabólicas en las aves, como la termorregulación, los patrones de alimentación y la ingesta de agua, así como el comportamiento innato y adquirido. Esto tiene un impacto en la tasa de apareamiento y la puesta de huevos, afectando la población de aves y la heterogeneidad del hábitat. Diversos trastornos y enfermedades como neurotoxicidad, enfermedades endocrinas y alteraciones en la reproducción celular están asociados a la exposición de las aves a plaguicidas y pesticidas. Esta exposición puede ser evaluada por medio de la prueba de micronúcleos y la relación heterófilo/linfocito (H/L) en sangre periférica de fauna silvestre y como un indicador del estado de salud y estrés en las aves.

El desarrollo de la presente contribución muestra el uso adecuado para aves, así como la forma de cuantificar e identificar las células de la prueba de micronúcleo y H/L. Se destaca la necesidad de tomar medidas efectivas para reducir la liberación de genotóxicos, promover prácticas agrícolas sostenibles y proteger los hábitats de las aves. De igual forma la importancia de la investigación sobre los mecanismos de genotoxicidad y desarrollar estrategias de conservación.

Palabras clave: Contaminantes genotóxicos, prueba de micronúcleos, indicadores ambientales.

Abstrac

Wild bird populations decline due to various environmental factors. One of them is environmental contamination, especially caused by pesticides and other genotoxins that are used in various agricultural and agro-industrial activities, as well as anthropic practices, which are important sources of contamination that affect the soil, water, and air.

Contaminants such as genotoxics, in addition to causing genetic modifications, affect various metabolic functions in birds, such as thermoregulation, feeding patterns and water intake, as well as innate and acquired behavior. This has an impact on the mating rate and egg laying, affecting the bird population and habitat heterogeneity. Various disorders and diseases such as neurotoxicity, endocrine diseases and alterations in cell reproduction are associated with the exposure of birds to pesticides and pesticides. This exposure can be evaluated through the micronucleus test and the heterophil/lymphocyte (H/L) ratio in peripheral blood of wildlife and as an indicator of health and stress status in birds.

The development of this contribution shows the proper use for birds, as well as how to quantify and identify the cells of the micronucleus and h/l test. The need to take effective measures to reduce the release of genotoxics, promote sustainable agricultural practices and protect bird habitats is highlighted. In the same way, the importance of research on the mechanisms of genotoxicity and the development of conservation strategies.

Key words: genotoxic contaminants, micronucleus test, environmental indicators.

INTRODUCCIÓN

Diversas actividades agropecuarias y agroindustriales, así como algunas prácticas antrópicas son fuentes importantes de contaminación. Estos contaminantes se depositan en el suelo, agua y aire los cuales posteriormente circulan a través del ambiente llegando a causar efectos adversos [1].

Algunos de estos contaminantes como los plaguicidas utilizados en la agricultura afectan a la vida silvestre [1]. A partir de 1940 aumentaron los estudios relacionados al uso del Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT) sobre cultivos vegetales y los efectos que causaba sobre las poblaciones de aves debido a una notable disminución [2].

La disminución en las poblaciones de aves también se ha relacionado con enfermedades causadas por agentes genotóxicos. Los genotóxicos son elementos capaces de modificar la replicación celular, más allá de tener efectos genéticos, se llegan a expresar de manera adversa afectando funciones metabólicas en las aves tales como la termorregulación, patrones de alimentación e ingesta de agua, así como de comportamiento innato y adquirido lo que influye en la disminución en la tasa de apareamiento y puesta de huevos, afectando a la población de aves, de tal forma que las afecciones alcanza las funciones ecosistémicas e interviene en el decremento de la heterogeneidad del hábitat [3].

Algunos trastornos como la neurotoxicidad y enfermedades endocrinas están relacionadas a los efectos causados por plaguicidas y pesticidas en las poblaciones de aves, al igual que los niveles superiores en productos con LD50 ya que la mortalidad aguda podría estar relacionada a la exposición crónica por absorción oral con la inhibición de la acetilcolina esterasa por parte de organoclorados, órganofosfatos y carbamatos [3].

Otros padecimientos causados por la exposición a contaminantes como los genotóxicos se debe a que estos elementos químicos se adhieran al alimento que llegan a consumir las aves (como semillas e insectos) afectando el éxito reproductivo y la supervivencia de las especies [4]. Los plaguicidas con mayor capacidad genotóxica para la avifauna silvestres son los organofosforados, carbamatos, piretroides y triazinas. De los plaguicidas resaltan los herbicidas, insecticidas y fungicidas los cuales afectan la genética de los organismos ocasionando cambios estructurales sobre los cromosomas o aberraciones cromosómicas (AC), irregularidades en la distribución cromosómica y alteraciones

durante la reproducción celular (tanto mitosis como meiosis), esterilidad y letalidad embrionaria, así como mutaciones en tejidos somáticos y células germinales expresados morfológicamente y en la descendencia [5].

En cuanto a los efectos patológicos y conductuales relacionados a herbicidas con atriazinas se encuentran una disminución en el alimento disponible, de los efectos físicos esta la pérdida de peso corporal, deshidratación, fallas en el control hipotalámico de la pituitaria ovárica, en el crecimiento de neoplásicos como linfomas, cáncer, linfohematopoyéticos y desnutrición como resultado de disminución de eritrocitos, hemoglobina y hematocritos [6].

Dentro de los ecosistemas las aves pueden ser utilizadas como monitoras de contaminación ambiental [7]. Por ejemplo, la presencia de gorriones de pastizal en ecosistemas maduros pueden ser un indicador del nivel de deforestación o destrucción del hábitat [8]. La prueba de micronúcleos se considera una técnica de evaluación de los efectos clastogénicos y aneugénicos por parte de contaminantes ambientales [4]. Esta técnica determina los eritrocitos micronucleados (EMN) y prolongaciones nucleares (EPN) en sangre periférica ya que es uno de los biomarcadores de efecto más versátil y utilizado debido a su efectividad, relativa sencillez, la rapidez en la obtención de resultados y por el bajo costo. Esta prueba es altamente informativa, ya que, al observar dichas estructuras en el citoplasma de las células analizadas, se corrobora que se perdió material genético, evento altamente relacionado con procesos carcinogénicos [9].

La prueba de EMN consiste en identificar y cuantificar el daño generado en el material genético de las células a partir de la presencia de micronúcleos (MN) o prolongaciones nucleares [9]. Los MN son fragmentos o cromosomas completos sin centrómeros que no están incorporados al núcleo de las células replicadas también llamadas células hijas, en el caso de los fragmentos estos se forman durante la transición de división celular durante la mitosis [9], mientras que los EPN se identifican como filamentos propios del núcleo que se forman como extensiones durante la transcripción celular.

Adicionalmente la relación Heterófilo /Linfocito (H/L; Figura 1) determina el estado de salud como indicador del sistema inmune [10], es el principal indicador de estrés en las aves, de modo que tener un conteo elevado indican niveles altos de glucocorticoides, enfermedades nutricionales e

infecciones bacterianas [11]. Los niveles de H/L en sangre están relacionados al estrés. El estrés en las aves es causado por diversos factores tales como la temperatura ambiental, en algunos casos el calor con temperaturas superiores a 30.4°C, otro factor asociado es la segregación del organismo de la parvada a causa de un desorden social como por ejemplo la presencia de un depredador. También la alimentación es clave para mantener un nivel estable de corticoides ya que un cambio hormonal altera la composición hematológica de este modo la falta de alimento es un promotor de estrés y altera la relación en los niveles H/L [10].

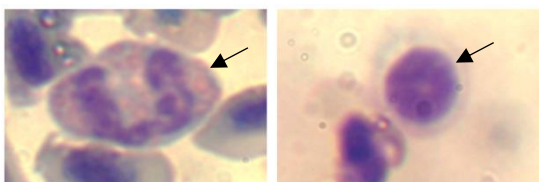


Figura 1. De lado derecho se muestra un heterófilo; izquierda se muestra linfocito (señalados con flecha respectivamente) pertenecientes a una muestra de sangre periférica de un ave en un frotis teñido con hemocolorante rápido Diff-Quik.

DESARROLLO

El uso de la prueba de EMN y la relación H/L trae varias ventajas, sin embargo; una de las desventajas es el aumento en los niveles de corticosterona en plasma después de la captura y su manipulación ya que se ha probado que esta aumenta de manera rápida en fauna silvestre [12].

Para la evaluación de la genotoxicidad en células hematológicas es conveniente que sea de sangre periférica debido a su producción y circulación por el torrente sanguíneo. Para la extracción de sangre periférica en las aves se recomienda extraer a cada individuo capturado una muestra de sangre (0.75 µL aproximadamente equivalente a una o dos gotas) mediante punción de la vena braquial/ulnar con una jeringa de insulina U-100 con aguja (sin espacio muerto) 1 mL 29GX 13 mm. Para cada ejemplar colectado se debe realizar dos frotis sanguíneos utilizando un portaobjetos previamente limpio, desengrasado y codificado, dejando secar al aire libre.

Posteriormente las muestras de frotis tomadas se deben fijar en etanol al 80% durante 10 minutos y enseguida ser teñidos. Uno de los frotis de cada

ejemplar se tiñe con hemocolorante rápido (Diff-Quik = DQ) durante 30 segundos en cada una de las tres soluciones, cada una debe ser lavada con agua destilada y secadas al aire libre. Para la segunda muestra se recomienda teñir en anaranjado de acridina (AC), dicha técnica se inicia preparando 1 litro de buffer dividido en dos cajas coplin, la primera caja con AC y la segunda únicamente con el buffer. Una vez que se pinta el frotis por 10 minutos en la primera caja y enjuagando en la segunda caja coplin por otros 10 minutos y se debe dejar secar los frotis a aire libre [9].

Para el conteo diferencial leucocitario y posteriormente obtener el índice H/L se contabilizan 100 leucocitos por organismo con el microscopio a 100x, para los frotis teñidos con AC se recomienda utilizar el mismo microscopio (100x) haciendo uso de una lámpara con fluorescencia. Por cada tinción se deben cuantificar 10,000 eritrocitos totales (ET) en los que se identifique la frecuencia de eritrocitos micronucleados (EMN), eritrocitos con prolongaciones nucleares (EPN) y eritrocitos policromáticos (EPC) [13].

DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los eritrocitos de las aves tienen un periodo de vida de 20 a 45 días, los EPC son eritrocitos en fase temprana o jóvenes que en comparación a los eritrocitos maduros se aprecian más grandes [13]. Los EPC se tiñen de color rojo con la tinción AC lo que facilita su identificación cuando se pretende contarlos en pruebas de periodos cortos de exposición [14]. Las aves con presencia de EPC mayores a 100/1000 ET se puede usar como biomarcador la frecuencia de EPC con micronúcleos cuando se sospecha de exposición a contaminantes genotóxicos en periodos cortos (alrededor de 24 horas), por lo anterior la ausencia de anomalías en los EPC de las aves de puede considerarse como indicador de que no han sido expuestas a compuestos genotóxicos.

Los MN se identifican como pequeños centros similares al núcleo de menor tamaño, completamente separados del núcleo principal pero siempre presente dentro del citoplasma del eritrocito (Fig. 2). Cuando se observa un número de 6 o más EMN/10,000 ET es señal de fallas en el bazo por posible exposición a sustancias genotóxicas [9]. Cuando se observa lo anterior se reconoce que estas especies son susceptibles a daño genotóxico y pueden ser propuestas como biomonitores mediante el uso de la prueba de micronúcleos [15].

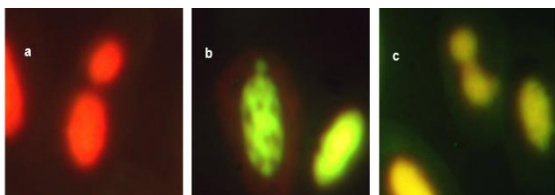


Figura 2. Eritrocitos de una muestra de sangre periférica de ave en frotis teñido con anaranjado de acridina. a) Eritrocito micronucleado; b) Eritrocito policromático con micronúcleo; c) Eritrocito con prolongación nuclear.

De igual forma es importante considerar que los eritrocitos pueden presentar prolongaciones nucleares, los cuales son similares a los MN, sin embargo, estos aún se encuentran unidos al núcleo principal del eritrocito (teniendo forma de cacahuete o hebra de cromatina) [16]. La formación de EPN en sangre periférica también está relacionada a la formación de EMN por exposición a sustancias genotóxicas [17].

CONCLUSIONES

La relación H/L presente en el sistema inmune de las aves indica el estado de salud y nivel de estrés, ya que estas células son los primeros agentes contra infecciones bacterianas, virales y parasitarias [18]. En las aves, el número y proporción de H/L reflejan la salud de los individuos y por ende de la población en general, sin embargo, la frecuencia observada de EPC y EMN sugiere la posibilidad de usar este tipo de células como biomarcador cuando se sospecha de exposición a genotóxicos. Es importante reconocer que los valores de estos biomarcadores hemáticos son altamente variables cuando se trata de establecer comparación con otras especies de aves, debido a diversos aspectos biológicos como si se encuentran en vida libre o cautiverio, sexo y edad, incluso entre aves residentes o migratorias [19], por esta razón se recomienda ampliar este tipo de estudios para generar valores de referencia.

La disminución de las poblaciones de aves en México es un tema complejo influenciado por varios factores, entre ellos los genotóxicos ambientales. Los pesticidas, los metales pesados y la contaminación del aire han demostrado efectos genotóxicos en las aves, lo que lleva a problemas reproductivos, alteración del comportamiento y disminución general de la población. Para mitigar estos efectos, se deben tomar medidas efectivas para reducir la liberación de genotóxicos al medio ambiente, promover prácticas agrícolas sostenibles y proteger los hábitats de las aves. Además, se

necesita más investigación para comprender mejor los mecanismos de genotoxicidad y desarrollar estrategias de conservación que salvaguarden la diversidad aviar de México. Solo a través de esfuerzos integrales podemos esperar revertir el declive y asegurar la supervivencia de las especies de aves de México.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Moriarty, F. *Ecotoxicology. Human & Experimental Toxicology*, 1988, 7(5):437. <https://doi.org/10.1177/096032718800700510>.
- [2] Sanz-Serrano, J., López de Cerain, A., Garayoa, R., Azqueta, A., & Vettorazzi, A. Genotoxicity evaluation of fried meat: A comprehensive review. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 136(110943). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110943>.
- [3] Köhler, H. R., & Triebkorn, R. Wildlife ecotoxicology of pesticides: Can we track effects to the population level and beyond? *Science*, 2013, 341(6147):759–765. <https://doi.org/10.1126/science.1237591>.
- [4] Baesse, C. Q., Tolentino, V. C. de M., Silva, A. M. da, Silva, A. de A., Ferreira, G. Â., Paniago, L. P. M., Nepomuceno, J. C., & Melo, C. Micronucleus as biomarker of genotoxicity in birds from Brazilian Cerrado. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 115: 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.024>.
- [5] Roldán-Reyes, E. Introducción a la toxicología. In *Introducción a la toxicología* (Universida). 2016. <https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/publicaciones/libros/cbiologica/libros/Toxico-ago18.pdf>.
- [6] Hussain, R., Mahmood, F., Khan, M. Z., Khan, A., & Muhammad, F. Pathological and genotoxic effects of atrazine in male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Ecotoxicology*, 2011, 20(1): 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0515-y>.
- [7] Egwumah, F. A., & Egwumah, P. O. Paramount Roles of Wild Birds as Bioindicators of Contamination. *International International Journal of Avian & Wildlife Biology*, 2017, 2(6):41. <https://doi.org/10.15406/ijawb.2017.02.00041>.
- [8] Rutkowska, M., Płotka-Wasyłka, J., Lubinska-Szczygeł, M., Różańska, A., Możejko-Ciesielska, J., & Namieśnik, J. Birds' feathers – Suitable samples for determination of environmental pollutants. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 109:97–115. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.022>.

[9] Torres-Bugarín, O., Carillo-Gómez, C. S., & Armijo-Gómez, J. A. Evaluación de genotóxicos ambientales mediante la prueba de micronúcleos en sangre periférica. In *Ecología y salud de la fauna silvestre* (Issue Universidad Juárez del Estado de Durango, 2019): 59–89.

[10] Téllez-Isaías, A., Tejeda-Perea, G., & Galindo-Maldonado, F. Técnica de medición de estrés en aves. In *Veterinaria México* 1997, 28:345–351). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.051>.

[11] Maxwell, M. H., & Robertson, G. W. The avian heterophil leucocyte: a review. *World's Poultry Science Journal*, 1998, 54(2):155–178. <https://doi.org/10.1079/wps19980012>.

[12] Davis, A. K., Maney, D. L., & Maerz, J. C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists. *Functional Ecology*, 2008, 22(5):760–772. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>.

[13] Clark, P., Boardman, W., & Raidal, S. Atlas of Clínica Avian Hematology (Wiley-BlackWell (ed.)). 2009.

[14] Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate, M. The micronuclei assay with mouse Peripheral blood reticulocytes using acridineorange-coatedslides. *Mutat Res.* 1990. 245(4): 245-249.

[15] Zúñiga-González, G., Torres-Bugarín, O., Luna-Aguirre, J., González-Rodríguez, A., Zamora-Perez, A., Gómez-Meda, B. C., Ventura-Aguilar, A. J., Ramos-Ibarra, M. L., Ramos-Mora, A., Ortíz, G. G., & Gallegos-Arreola, M. P. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): Part two. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2000, 467(1): 99–103. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00021-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00021-8).

[16] Fenech M. y J.W. Crott. 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res.* 504:131-136.

[17] Serrano-García L. y R. Montero-Montoya. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environ Mol Mutagen.* 2001, 38:38-45.

[18] Martínez Quintanilla, M. C., Torres Bugarín, O., Martínez Guerrero, J. H., Delgado León, T. G., Salas Pacheco, J. M., & Pereda Solís, M. E.

Relación heterófilo/linfocito, frecuencia espontánea de eritrocitos micronucleados y prolongaciones nucleares en el ganso nevado (*Chen caerulescens*): Una propuesta como posible biomonitor de estrés y genotóxicos ambientales. *Huitzil, Revista Mexicana de Ornitología*, 2017, 18(1):102–111. <https://doi.org/10.28947/hrmo.2017.18.1.268>

[19] Carbó-Ramírez, P., & Zuria, I. Immune condition and blood parasites in three sparrow species with different migratory status in central Mexico. *Avian Biology Research*, 2015, 8(3):167–174. <https://doi.org/10.3184/175815515X14371521830098>

ROLES DE CONTRIBUCIÓN

Rol	Autor (es)
Conceptualización	Amara Sahad Jiménez Chávez
Curación de datos	Amara Sahad Jiménez Chávez
Metodología	Amara Sahad Jiménez Chávez
Administración del proyecto	Amara Sahad Jiménez Chávez (igual) Guadalupe Javier Jiménez Santillán (igual)
Recursos	Amara Sahad Jiménez Chávez (igual) Guadalupe Javier Jiménez Santillán (igual)
Software	Amara Sahad Jiménez Chávez (igual) Guadalupe Javier Jiménez Santillán (igual)
Supervisión	Amara Sahad Jiménez Chávez
Validación	Amara Sahad Jiménez Chávez (igual) Guadalupe Javier Jiménez Santillán (igual)
Visualización	Amara Sahad Jiménez Chávez (igual) Guadalupe Javier Jiménez Santillán (igual)
Redacción	Amara Sahad Jiménez Chávez
Redacción	Amara Sahad Jiménez Chávez (igual) Guadalupe Javier Jiménez Santillán (igual)



Esta obra está bajo una licencia internacional Creative Commons Atribución 4.0.