

Pez Cebra (*Danio Rerio*) como modelo *In Vivo* para estudios de genotoxicidad: evaluación de inestabilidad cromosómica numérica

Zebrafish (*Danio Rerio*) as an *In Vivo* model for genotoxicity studies: evaluation of numerical chromosomal instability

Natalia Rodríguez Sosa¹, Diego F. Jaramillo García¹, Angel Iván Sánchez Espejo², Marleny Salazar Salazar³, Milena Rondón Lagos^{4*}

Resumen

Las actividades agrícolas, pecuarias y piscícolas que se desarrollan en Colombia han contribuido a la contaminación actual de las fuentes hídricas con plaguicidas, siendo este un problema ambiental en constante ascenso. Una de las fuentes hídricas con una alta tasa de contaminación es el lago Tota. Este lago ha sido catalogado como uno de los ecosistemas más amenazados del planeta por la red mundial de humedales. A pesar de los problemas ambientales que representa la contaminación de las fuentes hídricas en el país, existen muy pocos estudios que investiguen el daño citogenético generado por la exposición a agentes tóxicos. A este respecto, un modelo biológico óptimo para la evaluación de los efectos genotóxicos por la exposición ocupacional o ambiental a plaguicidas lo constituye el pez cebra, debido a su sensibilidad a los contaminantes, sensibilidad evidenciada por el daño al material cromosómico. Considerando lo anterior, el objetivo de esta investigación fue estandarizar técnicas de citogenética de bandas (Bandeo GTG) y de citogenética molecular (Hibridación *In Situ* por Fluorescencia - FISH), para su aplicación en estudios de genotoxicidad utilizando como modelo *in vivo*, larvas de pez cebra (*Danio rerio*). El desarrollo de este estudio permitió la estandarización de la técnica de Bandeó GTG para el conteo de cromosomas en larvas de pez cebra, así como la estandarización de la técnica FISH, importante en la evaluación de la inestabilidad cromosómica. La estandarización de técnicas de citogenética de bandas y de citogenética molecular en pez cebra, se constituye como una herramienta muy importante para la aplicación de modelos de estudio *in vivo* que permitan evaluar el daño cromosómico generado por la exposición a agentes genotóxicos, incluidos los plaguicidas

Palabras Clave: Citogenética, FISH, genotoxicidad, modelos *in vivo*, pez cebra.

Abstract

The agricultural, livestock and fish farming activities carried out in Colombia have contributed to the current contamination with pesticides of water sources, this being a constantly rising environmental problem. One such water source with a high rate of contamination is Lake Tota. This lake has been listed as one of the most threatened ecosystems on the planet by the global network of wetlands. Despite the environmental problems that contamination of water sources represents in our country, there are very few studies that investigate the cytogenetic damage generated by exposure to toxic agents. In this regard, an optimal biological model for the evaluation of the genotoxic effects of occupational or environmental exposure to pesticides is the zebrafish, due to its sensitivity to contaminants, sensitivity evidenced by damage to chromosomal material. Considering the above, the aim of this study was to standardize banding cytogenetics (GTG Banding) and molecular cytogenetics (Fluorescence *In situ* Hybridization-FISH) techniques, for their application in genotoxicity studies using zebrafish (*Danio rerio*) larvae as an *in vivo* model. The development of this study allowed the standardization of the GTG banding technique for the chromosome count in zebrafish larvae, as well as the standardization of the FISH technique, important in the evaluation of chromosomal instability. The standardization of banding and molecular cytogenetics on zebrafish, constitutes a very important tool for the application of *in vivo* study models that allow evaluate the chromosomal damage generates by the genotoxic agent's exposure, including the pesticides.

Keywords: Cytogenetic, FISH, genotoxicity, *in vivo* models, Zebrafish.

Recepción: 27-Enero-2023

Aceptación: 13-Marzo-2023

¹ Estudiantes de Biología. Décimo semestre, Grupo de Investigación en Ciencias Biomédicas-UPTC, Escuela de Ciencias Biológicas. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia.

² Estudiante Programa Licenciatura en Ciencias Naturales y Educación Ambiental, Facultad de Educación, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

³ PhD. Programa de Licenciatura en Ciencias Naturales y Educación Ambiental, Facultad de Educación, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

^{4,*} PhD. Escuela de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia. Dirección Electrónica: sandra.rondon01@uptc.edu.co

1. Introducción

El lago de Tota conforma el humedal de alta montaña más extenso del país [1] y la segunda cuenca con mayor extensión en Sur América. Se encuentra ubicado en el departamento de Boyacá específicamente entre los municipios de Aquitania, Tota y Cuítiva [2]. Esta cuenca hidrográfica se caracteriza por presentar servicios ecosistémicos de gran trascendencia para la población, entre ellos se destaca: abastecimiento de agua para el consumo, actividades productivas e industriales y el aprovisionamiento de alimentos [3]. Actualmente, es posible evidenciar una serie de problemáticas ambientales que repercuten en la funcionalidad del lago y, en consecuencia, en las poblaciones que allí habitan. Dentro de las principales fuentes de contaminación se encuentran: la escorrentía de agentes químicos (plaguicidas) empleados en los cultivos de la zona, especialmente de cebolla larga (*Allium fistulosum*) [1], la eutrofización, debida a la pérdida total de fósforo causada por el uso excesivo de plaguicidas organofosforados [4] y las constantes fumigaciones [5].

El uso persistente de plaguicidas se constituye como un grave problema de salud pública a nivel mundial debido a la morbilidad y mortalidad que estos agentes químicos pueden causar. Dado que los plaguicidas son sustancias que se han empleado para prevenir, destruir, repeler o mitigar plagas tanto en la agricultura como en la lucha contra vectores, su uso ha traído beneficios, pero también ha generado riesgos para el hombre, los animales y el medio ambiente [6]. Las actividades agroindustriales representan serios problemas de intoxicación para la población humana, de hecho, el Instituto Nacional de Salud de la mano con el Sivigila [7] reportaron en su investigación 8245 intoxicaciones en el 2013, seguido por 9214 en 2014 y 8732 casos de intoxicaciones para el 2015 en Colombia. Aún más preocupante, en el departamento de Boyacá los plaguicidas son la primera causa de intoxicación, así mismo, el 44,7% de los casos se produjeron con mayor frecuencia en zonas rurales, en donde se informa que sus principales causas fueron ocupacional y accidental [8].

En Colombia y en Boyacá, son pocos los estudios que evidencian el efecto deletéreo de los plaguicidas sobre el material genético de diferentes especies, incluyendo a humanos y a

peces. Lo anterior, muestra la necesidad del uso de modelos biológicos como el pez cebrá, que permita la evaluación de un posible daño genético por exposición a plaguicidas, así como realizar seguimiento a las poblaciones expuestas a los mismos.

Las investigaciones realizadas hasta la fecha muestran que el pez cebrá (*Danio rerio*) es un modelo biológico de gran importancia para el desarrollo de estudios de genotoxicidad por exposición a plaguicidas. Lo anterior debido a la alta sensibilidad de este organismo a los cambios ambientales y su alta homología con el genoma humano [9]. De hecho, en los últimos años, el pez cebrá se ha convertido en un importante modelo biológico para las actividades científicas y experimentales, incluidos los estudios que buscan comprender la dinámica (daño del ADN) de diversas sustancias tóxicas. Por ejemplo, investigaciones recientes indican que su genoma es aproximadamente la mitad del tamaño de la mayoría de los genomas de los mamíferos y contiene alrededor de 4,6 picogramos (pg) de ADN que se encuentran distribuidos en 25 pares de cromosomas [10].

Este organismo, además de poseer genes similares a los humanos, se destaca por compartir un alto nivel de homología fisiológica en donde se incluye el cerebro, el tracto digestivo, la musculatura y el sistema inmune innato. Por tanto, es posible inducir diferentes mutaciones genéticas o activar vías de señalización mediante el uso de productos químicos, así como inducir tumores en una amplia variedad de órganos [11] como el hígado, el páncreas, el canal intestinal, la piel, los músculos, la vasculatura y los testículos. Adicionalmente, el pez cebrá tiene la capacidad de imitar el carcinoma humano en el sentido de que exhibe aneuploidía masiva y heterogeneidad en el mismo tumor [12].

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este estudio fue estandarizar técnicas de citogenética de bandas (Bandeo GTG) y de citogenética molecular (FISH) sobre larvas de pez cebrá, y de esta manera postular su uso como modelo biológico en estudios de genotoxicidad. El éxito de los estudios citogenéticos depende de que los cromosomas se hayan diseminado correctamente y de una correcta expresión de patrones de bandeado. Sin embargo, la inconsistencia de la

distribución cromosómica óptima sigue siendo un problema importante en los estudios citogenéticos.

2. Materiales y métodos

2.1. Preparación de acuarios y alimentación

La preparación de los acuarios se realizó mediante el uso de agua con pH entre 6.5 y 7.0, grava (para que los desechos orgánicos y los huevos queden fijos y no en suspensión), adorno artificial (para simular en lo posible el entorno natural) y dos sistemas de filtración. La alimentación se realizó 3 veces al día, empleando tanto alimento vivo (*Artemia salina*) como comida en hojuelas.

2.2. Obtención de larvas

Los huevos fueron retirados de la grava mediante el uso de una aspiradora de bomba manual, luego fueron lavados y finalmente transferidos a caja de Petri conteniendo agua destilada. Las cajas de Petri conteniendo los huevos fueron incubadas a 28°C por un periodo de 72 - 90 horas.

2.3. Obtención de metafases y núcleos interfásicos

La obtención de las suspensiones celulares conteniendo las metafases y los núcleos interfásicos (*pellets*), se realizó usando protocolos de recolección previamente estandarizados en el laboratorio de investigación BIOEDUQ de la Universidad del Quindío. Brevemente, larvas de 3 a 6 días post eclosión, fueron depositadas en tubos eppendorf conteniendo solución de colchicina 0.15% + DMSO 2%, por 6 horas. Transcurrido este tiempo, las larvas fueron tratadas con solución hipotónica (KCl 0.075 M) por 18 minutos y fijadas tres veces con fijador carnoy (Metanol – Ácido acético 3:1).

2.4. Extendidos metafásicos y dispersión de los cromosomas

Para la realización de los extendidos metafásicos se usó un baño serológico. Brevemente, doce (12) microlitros de la suspensión celular en fijador carnoy obtenida previamente, se dejaron caer sobre un portaobjetos desde una altura de 1 cm y con grado de inclinación de 45°C. Con el objetivo de lograr una correcta dispersión de los cromosomas, la suspensión celular (conteniendo las metafases y núcleos interfásicos) fue extendida sobre portaobjetos secos, o con agua, o con fijador carnoy. Así obtenidos, los extendidos metafásicos fueron expuestos a diversas condiciones de temperatura y humedad (Tabla 1).

Específicamente, los portaobjetos con los extendidos cromosómicos fueron colocados sobre un baño serológico a 68°C hasta la evaporación total del fijador carnoy. El baño serológico se utilizó para proporcionar la humedad y la temperatura adecuada para el secado de las células y la propagación

de los cromosomas. De la misma manera, se realizaron los extendidos cromosómicos a T° ambiente con una humedad relativa del 78%.

2.5. Análisis Citogenéticos – Bando G con tripsina y Giemsa (Bando GTG)

Las placas conteniendo las metafases obtenidas previamente, fueron deshidratadas a 80°C durante 2 horas e incubadas en tampón 2xSSC por 30 minutos. Luego las preparaciones fueron sometidas a tripsina a concentración de 0,25% (Gibco, Life Technologies, Nebraska, USA) por diferentes tiempos, incluyendo: 1 segundo, 2 segundos, 3 segundos y 4 segundos. El establecimiento del tiempo adecuado en tripsina se constituye como un paso primordial en la obtención de un patrón de bandas específico para cada cromosoma. Pasado el tiempo de incubación en tripsina, las preparaciones metafásicas fueron coloreadas con Giemsa (Sigma, St. Louis, MO, USA) por 10 minutos. Finalmente, las metafases bandeadas fueron visualizadas y analizadas usando un microscopio Olympus. Las imágenes fueron adquiridas mediante el uso del software Cytovision System 7.4 (Leica Biosystems Richmond, VA, USA).

2.6. Hibridación *In Situ* (FISH) por Fluorescencia

FISH se realizó sobre núcleos interfásicos y metafases usando sondas NOR (Nucleolar Organizing Regions) humanas, marcadas con fluorocromo rojo (LPE NOR, Cytocell, Cambridge). Las sondas NOR son específicas para los genes de ARNr ubicados en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos. Estos genes de ARNr son de importancia crítica para la viabilidad celular. Las NOR contienen grupos de genes que codifican las tres moléculas de ARNr estructural más grandes (5.8S, 18S y 28S). La localización cromosómica de los principales ADN ribosómicos (18S, 5.8S y 28S), correspondientes a NOR, aplicando FISH sobre cromosomas de pez cebra ha sido reportada en estudios previos [13]. Se analizaron ocho áreas seleccionadas al azar utilizando un microscopio Olympus con el software citogenético Cytovision System 7.4 (Leica Biosystems Richmond, Inc.).

3. Resultados y discusión

La agricultura, específicamente el monocultivo de cebolla larga es sin duda la actividad que genera el mayor grado de transformación en la cuenca del Lago de Tota. Como se indicó anteriormente, son múltiples los efectos que se presentan como consecuencia del uso y manejo inadecuado del material orgánico, de productos químicos de uso agrícola (plaguicidas y fungicidas) y de las aguas de riego y escorrentía utilizados para esta labor productiva. Estos tres elementos, sumados a la densidad e intensidad del cultivo, son la base de las tensiones ambientales en este ecosistema [14]. Dichos efectos han sido evaluados principalmente mediante caracterizaciones fi-

Tabla 1: Tratamientos aplicados en las parcelas

No	Porta Objetos	H	T°
1	Seco	78 %	Ambiente
2		90 %	68°C
3	Con agua antes del extendido de pellets	78 %	Ambiente
4		90 %	68°C
5	Con fijador carnoy antes del extendido de pellets	78 %	Ambiente
6		90 %	68°C

T°, Temperatura; H, humedad relativa

sicoquímicas de agua y sedimentos, análisis toxicológicos en algunos vertebrados e invertebrados presentes en el cuerpo de agua y la identificación de los plaguicidas utilizados en la cuenca. Sin embargo, los estudios de genotoxicidad por exposición a plaguicidas son escasos o nulos por lo que, a la fecha, la frecuencia y el tipo de daño celular y genético generado por la exposición a los compuestos tóxicos presentes en el lago de Tota son desconocidos.

Durante décadas, el pez cebrá se ha empleado para pruebas de toxicidad ambiental y calidad del agua, siendo la primera especie de pez en la que se desarrollaron experimentos asociados con la carcinogénesis. El pez cebrá es un organismo importante para el estudio de vertebrados en una gran variedad de disciplinas biológicas debido a su alta fecundidad y rápida generación que favorecen los análisis genéticos, además, pueden ser fácilmente mantenidos en acuarios. Por ello, esta especie ha adquirido gran importancia en los últimos años ya que ha resultado ser un excelente modelo para la investigación de diversas patologías y enfermedades humanas, entre ellas el cáncer [15, 16], en química toxicológica, estudios de neurobiología (neuroanatómica y neuroquímica) [17] y en la evaluación morfológica de los efectos de la exposición ambiental a variedad de compuestos [18].

El pez cebrá y el humano comparten gran parte del genoma (aproximadamente el 70%), incluyendo el 82% de genes asociados a enfermedades como el cáncer, el Alzheimer, el Parkinson y algunas cardiopatías [19]. A este respecto, se han realizado descripciones detalladas de la anatomía del embrión y la larva del pez cebrá y se han desarrollado metodologías robustas que permiten la experimentación, destacando el estudio de la mutagénesis a gran escala en este modelo biológico para indagar acerca de las alteraciones cromosómicas numéricas (aneuploidía) y estructurales, la función de los genes y la heterogeneidad característica de enfermedades como el cáncer [20].

Este organismo, además de poseer genes similares a los humanos, también se destaca por compartir un alto nivel de homología fisiológica, en donde se incluye el cerebro, el tracto digestivo, la musculatura y el sistema inmune innato, por lo que se estima que aproximadamente se pueden reproducir en el pez cebrá 8 de cada 10 enfermedades humanas [21], incluyendo la inducción de tumores en una amplia variedad

de órganos como el hígado, el páncreas, el canal intestinal, la piel, los músculos, la vasculatura y los testículos [11]. Adicionalmente, es posible evaluar diferentes mutaciones genéticas o activar vías de señalización mediante el uso de productos químicos.

La incorporación del pez cebrá al listado de animales empleados en los procedimientos experimentales ha supuesto la consolidación de este modelo animal. De hecho, su uso se ha incrementado debido a sus ventajosas características, permitiendo enfocar numerosas áreas de estudio desde nuevas perspectivas [22]. Por ejemplo, en diversos estudios de toxicidad se ha determinado la capacidad del pez cebrá para regenerarse, adaptarse y responder inmunológicamente a altas concentraciones de sustancias químicas como el arsénico, el plomo y el glifosato [23]. Sumado a estos factores, su estudio representa un gran valor para la salud y la prevención, pues la exposición humana a químicos ambientales se asocia con toxicidad aguda y consecuencias a largo plazo que incluyen anomalías congénitas y crónicas, cáncer e incluso, muerte [18].

Los embriones de pez cebrá expuestos a carcinógenos exhiben una amplia variedad de neoplasias que se derivan principalmente de tejidos epiteliales, mesenquimáticos y neurales, donde el hígado representa el principal órgano afectado por la exposición a este tipo de agentes en cualquier etapa de desarrollo [24]. Muchos de estos agentes tóxicos se introducen en el medio ambiente especialmente por medio del vertimiento de aguas residuales en fuentes hídricas y conforme pasan los años, la presencia de estas sustancias tiende a ser mayor. De acuerdo con ello, la contaminación de ecosistemas acuáticos y su efecto sobre las poblaciones que allí habitan, han sido reconocidas como una de las principales emergencias ambientales actuales [25].

Considerando lo anterior, el pez cebrá se constituye como un excelente modelo biológico y en un prototipo ideal para la evaluación de los efectos genotóxicos por exposición ocupacional o ambiental a sustancias químicas [25] debido a su sensibilidad a los contaminantes, sensibilidad evidenciada por daño al material genético (rupturas, inserciones y deleciones cromosómicas). Además, en la actualidad existen pocos modelos animales en los que sea posible estudiar los efectos de la exposición a sustancias tóxicas [18]. Las investigacio-

nes realizadas hasta la fecha muestran que el pez cebra es un modelo biológico de gran importancia para el desarrollo de estudios de toxicidad y genotoxicidad por exposición a pesticidas presentes en fuentes de agua como el lago Tota.

La orientación citogenética en investigaciones acerca de genotoxicidad por exposición a contaminantes ambientales sobre organismos modelo y/o especies centinela está poco desarrollada a nivel nacional. Concretamente son escasos los estudios que indagan acerca del daño causado al material genético en peces expuestos a sustancias tóxicas o aguas contaminadas con dichos agentes, y aún más limitada es la aplicación de técnicas de citogenética de bandas y molecular para la evaluación de los posibles efectos producidos sobre los cromosomas de este grupo de vertebrados. Adicionalmente, la evaluación de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica junto con el ensayo cometa, son los biomarcadores mayormente utilizados en estudios de genotoxicidad en peces. Lo anterior debido a la rapidez y sensibilidad de las técnicas para identificar el daño al ADN, así como un alto valor predictivo en la detección de efectos citogenéticos causados por exposición a contaminantes ocupacionales y medioambientales [26, 27]. Tales factores han incentivado el uso de estas metodologías en las investigaciones enfocadas en evaluar toxicidad y daño genético en peces en Colombia, siendo objeto de estudio especies ícticas de importancia comercial del río Magdalena [28], además de otras como *Prochilodus magdalenae* y *Oreochromis sp.* [29].

Los estudios desarrollados hasta la fecha evidencian la importancia de la implementación de un modelo biológico como el pez cebra para la evaluación de alteraciones cromosómicas (en los 25 pares de cromosomas del pez cebra [10]) de tipo numérico y estructural, inducido por la exposición a genotóxicos, como los encontrados con mayor frecuencia en análisis toxicológicos de aguas del Lago de Tota, y que incluyen a los plaguicidas Mancozeb y Malathion.

Las pruebas de genotoxicidad aplicadas en peces tienen como principio el aislamiento celular y la cuantificación del daño causado al material genético [30], aplicaciones en las cuales el análisis citogenético y las técnicas de bandeado, como el bandeado GTG, proporcionan herramientas robustas para la observación de la estructura de los cromosomas en vertebrados superiores, incluidos los humanos [31]. El éxito de los estudios citogenéticos depende, entre otros, de la correcta diseminación o dispersión de los cromosomas, y del establecimiento del tiempo adecuado en tripsina. No obstante, la inconsistencia de la distribución cromosómica óptima y la obtención de un patrón de bandas específico para cada cromosoma, siguen siendo importantes limitantes en los estudios citogenéticos.

Considerando lo anterior, la primera parte de este estudio se enfocó en determinar las condiciones de extendido, temperatura y humedad óptimas para la obtención de metafases con una adecuada dispersión cromosómica, puesto que de esta caracterización depende en gran medida la separación o dis-

persión de cromosomas, ya que la velocidad de la evaporación del fijador carnoy incide directamente en la distancia entre cromosomas. Para lo anterior, se analizaron los efectos de la altura de caída de la suspensión celular, el estado del portaobjetos (seco, con agua o con fijador carnoy), el tiempo de secado, la proporción de fijador, la temperatura y la humedad relativa sobre la calidad de los extendidos metafásicos.

La evaluación de estas variables permitió determinar que la humedad sobre el portaobjetos fue la variable que más afectó la dispersión cromosómica. Se obtuvo una mejora constante en factores de dispersión como un área de metafase más grande, menos superposiciones de cromosomas o frecuencias más bajas de metafases rotas cuando los portaobjetos con los extendidos metafásicos fueron expuestos a una temperatura de 68°C y una humedad relativa de 90%. Esto se logró realizando el extendido de las metafases sobre portaobjetos de vidrio secos colocados en un baño de agua cubierto a 68°C. Lo anterior se explica por el hecho que, a esta temperatura y humedad la velocidad de evaporación del fijador carnoy es menor, lo que conduce a que los cromosomas se dispersen lentamente a medida que el fijador se evapora, por lo que a mayor velocidad de evaporación del fijador menor dispersión cromosómica y viceversa, evidenciando una relación inversamente proporcional entre estas variables (Figura 1).

Con el objetivo de obtener un patrón de bandas específico para cada cromosoma, se procedió a la estandarización de diferentes tiempos de incubación con solución de tripsina al 0,25%. A pesar de que se usaron diferentes tiempos (1 segundo, 2 segundos, 3 segundos y 4 segundos) no fue posible evidenciar un patrón de bandas claro, siendo la principal limitante el tamaño de los cromosomas (Figura 2).

Esta limitante ha sido reportada en estudios previos, en donde ha sido indicado que los cromosomas de los peces son más pequeños y presentan un rango más estrecho de valores de GC% en genomas completos [32, 33]. De hecho, investigaciones recientes [34] indican que específicamente para el pez cebra, la aplicación de citogenética de bandas ha demostrado varias dificultades relacionadas con la correcta clasificación de los cromosomas basados en su tamaño, patrón de bandas y morfología, por lo que los esfuerzos realizados con el objetivo de estandarizar metodologías de bandas cromosómicas, especialmente bandeado G, han sido poco exitosos al no producir patrones de bandas utilizables en estos organismos [31].

A pesar que se obtuvieron cromosomas con buena morfología y tamaño, no fue posible evidenciar un patrón claro y óptimo de bandeado. Sin embargo, se destaca el hecho de que el uso de la citogenética de bandas en este modelo, así como el protocolo estandarizado propuesto para la obtención de metafases con una adecuada dispersión cromosómica (Tabla Suplementaria 1), puede ser aprovechado para el análisis de alteraciones de tipo numérico y por tanto, para la evaluación de inestabilidad cromosómica numérica por exposición a agentes genotóxicos.

Adicionalmente, es importante resaltar que las metafases y

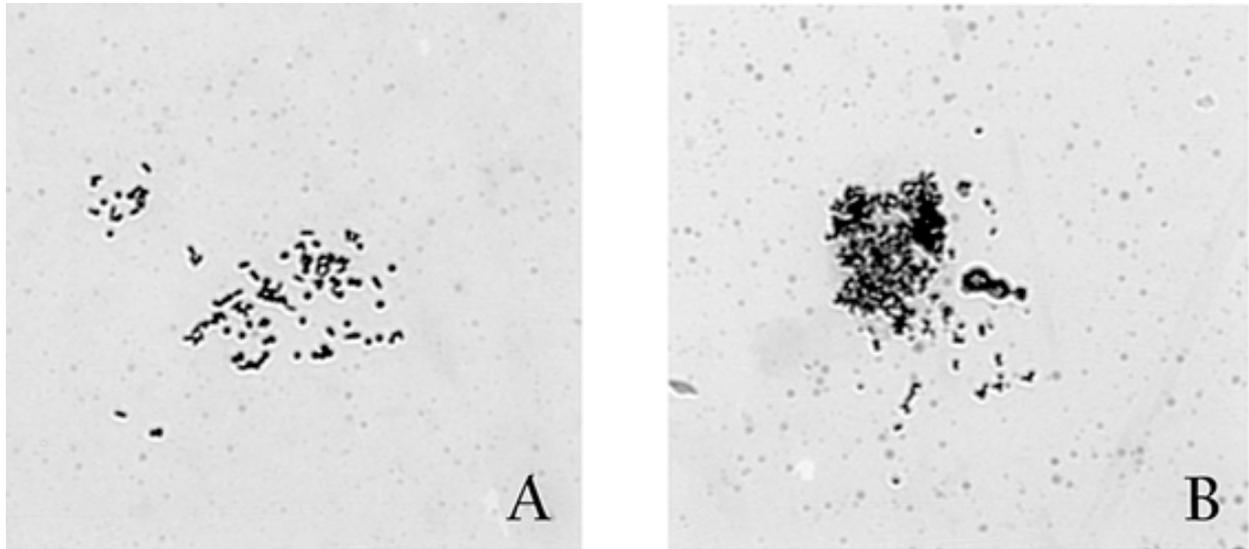


Figura 1: Dispersión cromosómica en pez cebra (*Danio rerio*). Extendidos metafásicos expuestos diferentes condiciones de temperatura y humedad. A) Metafase con una correcta dispersión cromosómica, sometida a una T° de 68°C y humedad relativa del 90%. B) Metafase con reducida dispersión cromosómica, sometida a T° ambiente y humedad relativa del 78%.



Figura 2: Cromosomas pez cebra (*Danio rerio*) obtenidos mediante la técnica Bando GTG. Se observan cromosomas con buena morfología y longitud. Sin embargo, el patrón de bando GTG no se evidencia claramente.

núcleos interfásicos obtenidos se constituyen como muestras importantes para la evaluación de alteraciones cromosómicas numéricas y para el estudio de inestabilidad cromosómica mediante FISH.

Las investigaciones realizadas hasta la fecha demuestran las dificultades que representa la estandarización de técnicas de citogenética de bandas no solamente sobre el pez cebra, sino sobre los peces en general, por lo que la estandarización de técnicas de citogenética molecular (FISH) se constituye como necesaria y prometedora en la evaluación de daño cromosómico por exposición a agentes genotóxicos.

En FISH, sondas locus específicas, centroméricas y/o NOR son usadas para identificar la presencia tanto de alteraciones de tipo numérico como estructural, por lo que su uso podría permitir, no solo indagar acerca de los efectos deletéreos sobre el número de cromosomas del pez cebra y por ende la evaluación de inestabilidad cromosómica, sino incrementar las posibilidades de utilizar este modelo en estudios de investigación biomédica.

De hecho, los resultados obtenidos en este estudio permiten postular el uso de sondas NOR en la evaluación de inestabilidad cromosómica numérica en pez cebra. Lo anterior teniendo en cuenta que, las variaciones en el número de cromosomas pueden ser fácilmente evidenciadas por el conteo del número de señales fluorescentes en extendidos tanto metafásicos como de núcleos interfásicos. Específicamente, el uso de la sonda NOR (LPE NOR. Fluorocromo rojo. Cytocell) sobre núcleos interfásicos de larvas del pez cebra, permitió identificar variaciones en el número de las señales emitidas por núcleo analizado, las que oscilaron entre 6 y 10 señales (Figura 3). Nuestras observaciones son concordantes con estudios previos en pez cebra [13], en donde fueron observadas entre siete a ocho señales de ADNr por núcleo interfásico.

La implementación de protocolos de citogenética molecular como FISH, se encuentra ampliamente extendida en la detección de alteraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales, las cuales se pueden analizar mediante la localización, disposición y recuento de secuencias individuales de interés, y visualizar a través de fluoróforos unidos a la sonda de hibridación en células en metafase e interfase por igual [35]. Sin embargo, a pesar de los enormes y rápidos avances en esta técnica molecular, la introducción de FISH para el estudio de alteraciones cromosómicas causadas por sustancias químicas aún no está generalizada [36], por lo que su aplicación en estudios de genotoxicidad usando como modelo biológico el pez cebra, es prometedora. Considerando lo anterior, como resultado de este estudio se propone un protocolo para la realización de ensayos FISH usando sondas NOR sobre preparados metafásicos y de núcleos interfásicos obtenidos del pez cebra (Tabla Suplementaria 2). Se considera que la implementación de este protocolo se constituye como una alternativa viable en la investigación de genotoxicidad sobre este organismo.

En lo que respecta al tipo de sondas específicas usadas con mayor frecuencia en pez cebra, es escasa la información disponible, por lo que los investigadores han empleado sondas de ADN para regiones cromosómicas específicas de este biotipo y sondas NOR humanas.

El uso de sondas para regiones cromosómicas específicas se ha convertido en una herramienta útil para estudios de identificación y confirmación de translocaciones inter cromosómicas y deleciones terminales, ya que facilitan un análisis rápido y preciso de la inestabilidad genómica y la susceptibilidad al cáncer en ensayos de pez cebra haploide [37]. En lo que respecta al uso de sondas NOR humanas, ha sido indicado que dichas sondas son ideales para estudios citogenéticos porque proporcionan señales de hibridación aptas para el reconocimiento cromosómico directo en preparaciones de cromosomas en metafase, y una enumeración cromosómica precisa en núcleos interfásicos [38]. Teniendo en cuenta que el pez cebra y el ser humano comparten gran parte del genoma (aproximadamente el 70%) [19], la implementación de las sondas NOR se constituye como una buena alternativa en estudios de genotoxicidad sobre pez cebra [13].

4. Conclusiones

El uso del pez cebra como modelo biológico, es sin duda una herramienta clave para lograr dilucidar el efecto deletéreo sobre los cromosomas por exposición a agentes genotóxicos, incluyendo a los plaguicidas.

Nuestros hallazgos nos permiten indicar qué si bien la citogenética de bandas se constituye como una excelente herramienta en la evaluación de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales en seres humanos, su uso es limitado en el pez cebra debido al corto tamaño de los cromosomas, siendo este un impedimento para la correcta obtención de un patrón de bandas adecuado. Sin embargo, se resalta que si bien, no fue posible obtener un patrón de bandeado óptimo en los cromosomas del pez cebra, el uso de la citogenética de bandas en este modelo puede ser aprovechado para el análisis de alteraciones de tipo numérico y por ende para la evaluación de inestabilidad cromosómica numérica por exposición a agentes genotóxicos. Considerando lo anterior, se recomienda el uso de FISH con sondas NOR, como una técnica óptima y confiable en la evaluación de daño genotóxico por exposición a plaguicidas, usando como modelo biológico el pez cebra.

Los resultados de este estudio representan un punto de partida para desarrollar estrategias y estudios dirigidos a salvaguardar las fuentes hídricas del país y así mismo, la salud de las poblaciones que habitan en las zonas aledañas.

5. Conflicto de intereses

Los autores declaran que la investigación se realizó en ausencia de cualquier relación comercial o financiera que pudiera interpretarse como un potencial conflicto de interés.

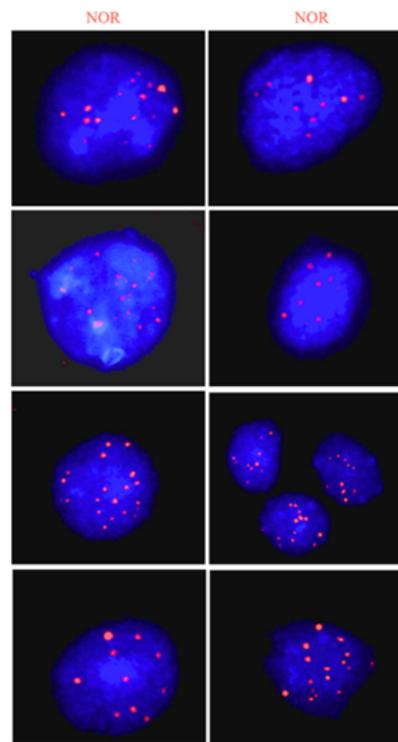


Figura 3: Imágenes representativas de FISH en larvas de pez cebra (*Danio rerio*). FISH se realizó sobre núcleos interfásicos usando sondas NOR (Regiones Organizadoras Nucleolares), específica para los genes de ARNr marcada con espectro rojo.

6. Contribución de los autores

Todos los autores contribuyeron a la concepción y el diseño del estudio.

7. Financiación

Este estudio no recibió ninguna subvención específica de agencias de financiación en los sectores público, comercial o sin fines de lucro.

8. Agradecimientos

A la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, así como también, al Semillero de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (SICBA) adscrito al Grupo de Investigación en Ciencias Biomédicas (GICBUPTC), y finalmente, a la Universidad del Quindío.

Referencias

- [1] D. M. Tinjacá López, “Formulación de estrategias de planificación ambiental y sectorial en la cuenca del Lago de Tota, fundamentadas en los objetivos de oferta, demanda, calidad, riesgo y gobernanza establecidos en la política nacional para la gestión integral del recurso hídrico,” Universidad Militar Nueva Granada, 2013.
- [2] Republica de Colombia - Departamento Nacional de Planeación - Conpes 3801, “Conpes 3801 - Manejo Ambiental Integral de la Cuenca Hidrográfica del Lago de Tota,” Bogotá, 2014. [Online]. Available: <https://colaboracion.dnp.gov.co/CDT/Conpes/Economicos/3801.pdf>
- [3] C. Montañez Velasquez, “Caracterización y mapeo participativo de servicios ecosistémicos en paisajes socio-ecológicos de producción.,” Pontificia Universidad Javeriana, 2018.
- [4] Liu, L., Zheng, X., Wei, X. et al., “Excessive application of chemical fertilizer and organophosphorus pesticides induced total phosphorus loss from planting causing surface water eutrophication”. *Sci Rep* 11, 23015, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-02521-7.
- [5] Corpoboyacá. Plan de ordenación y manejo de la cuenca del lago de Tota. Boyacá [Internet]. Boyacá: Pontificia Universidad Javeriana – Instituto de Estudios Ambientales para el Desarrollo; 2017. Available from: <https://www.corpoboyaca.gov.co/cms/wp-content/uploads/2015/11/diagnostico-problematika-ambiental-lago-tota.pdf>
- [6] P. Chaparro-Narváez and C. Castañeda-Orjuela, “Mortalidad debida a intoxicación por plaguicidas en Colombia entre 1998 y 2011,” *Biomédica*, vol. 35, no. 0, pp. 2–37, 2015, doi: 10.7705/biomedica.v35i0.2472.

- [7] Instituto Nacional de Salud - Sistema de Vigilancia en Salud Pública. Intoxicaciones por sustancias químicas [Internet]. Bogotá; 2017. Available from: <https://www.ins.gov.co/BibliotecaDigital/PRO-Intoxicaciones.pdf>
- [8] Secretaria de Salud de Boyacá. Informe del comportamiento epidemiológico de las intoxicaciones por sustancias químicas en Boyacá con corte a semana epidemiológica 28 de 2021 [Internet]. Boyacá; 2021. Available from: <https://www.boyaca.gov.co/informes-de-eisp/>
- [9] Álvarez Garzón C. Efectos teratogénicos del Nitrato de Plomo en el desarrollo embrionario del pez cebrá *Danio rerio* [Internet]. Pontificia Universidad Javeriana; 2011. Available from: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8844/tesis788.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [10] J. L. Freeman et al., “Definition of the zebrafish genome using flow cytometry and cytogenetic mapping,” *BMC Genomics*, vol. 8, no. 1, p. 195, 2007, doi: 10.1186/1471-2164-8-195.
- [11] S. Zhao, J. Huang, and J. Ye, “A fresh look at zebrafish from the perspective of cancer research,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 34, no. 1, p. 80, 2015, doi: 10.1186/s13046-015-0196-8.
- [12] G. J. Zhang, S. Hoersch, A. Amsterdam, C. A. Whitaker, J. A. Lees, and N. Hopkins, “Highly aneuploid zebrafish malignant peripheral nerve sheath tumors have genetic alterations similar to human cancers,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 39, pp. 16940–16945, 2010, doi: 10.1073/pnas.1011548107.
- [13] E. Gornung, I. Gabrielli, S. Cataudella, and L. Sola, “CMA3-banding pattern and fluorescence in situ hybridization with 18S rRNA genes in zebrafish chromosomes,” *Chromosom. Res.*, vol. 5, no. 1, pp. 40–46, 1997, doi: 10.1023/A:1018441402370.
- [14] D. M. Chaparro Cardozo and M. E. Peñalosa Otero, “Un Camino al Desarrollo Territorial: la especialización en la producción de Cebolla de Rama ‘*Allium Fistulosum*’ en el municipio de Aquitania – Boyacá,” *Cuad. Latinoam. Adm.*, vol. 8, no. 14, pp. 69–81, 2016, doi: 10.18270/cuadrlam.v8i14.1232.
- [15] M. Fernández-Riesco, “Aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas en la línea germinal del pez *Danio rerio* Application of new biotechnological tools in zebrafish (*Danio rerio*) germ line . Departamento de Biología Molecular,” Universidad de León, 2005.
- [16] M. Mimeault and S. K. Batra, “Emergence of zebrafish models in oncology for validating novel anticancer drug targets and nanomaterials,” *Drug Discov. Today*, vol. 18, no. 3–4, pp. 128–140, 2013, doi: 10.1016/j.drudis.2012.08.002.
- [17] Quelle Regaldíe A. Estudio experimental de las conexiones tectales y cerebrales en el pez cebrá (*Danio rerio*) [Internet]. Universidad de Coruña; 2014. Available from: <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/13894>.
- [18] K. Bambino and J. Chu, “Zebrafish in Toxicology and Environmental Health,” in *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 124, pp. 331–367, 2017.
- [19] S. Solís Angeles, “Alteraciones en el desarrollo embrionario del pez cebrá por exposición a muestras del Río Atoyac y descargas industriales,” Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
- [20] J. Yen, R. M. White, and D. L. Stemple, “Zebrafish models of cancer: Progress and future challenges,” *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 24, no. 1, pp. 38–45, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.gde.2013.11.003.
- [21] Armengol, M. (2017). El pez cebrá como modelo de investigación [Instituto de Oncología Vall d’ Hebron]. https://www.researchgate.net/publication/322245677_Pez_cebra_como_modelo_en_investigacion_biomedica.
- [22] R. Vargas, “Pez cebrá (*Danio rerio*) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica,” *Anest. en México*, vol. 29, no. 1, pp. 86–96, 2017, [Online]. Available: <http://www.scielo.org.mx/pdf/am/v29s1/2448-8771-am-29-00086.pdf>.
- [23] K. García, M. Salazar, and J. García, “Efecto del neonicotinoide - tiametoxam en el desarrollo embrionario del pez cebrá (*Danio rerio*),” *Rev. toxicol.*, vol. 35, pp. 22–27, 2018, [Online]. Available: <http://rev.aetox.es/wp/wp-content/uploads/2018/06/Revista-de-Toxicologia-35.1-26-31.pdf>.
- [24] J. M. Spitsbergen and M. L. Kent, “The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research - Advantages and current limitations,” *Toxicol. Pathol.*, vol. 31, no. SUPPL., pp. 62–87, Jan. 2003, doi: 10.1080/01926230390174959.
- [25] L. Rocco, A. Izzo, G. Zito, and C. Peluso, “Genotoxicity in Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed to two Pharmacological Products from an Impacted Italian River,” *J. Environ. Anal. Toxicol.*, vol. 01, no. 02, 2011, doi: 10.4172/2161-0525.1000103.
- [26] D. L. Castillo-Salas, J. C. Gaytán-Oyarzun, M. López-Herrera, and M. A. Sánchez-Olivares, “Pez cebrá (*Danio rerio*): modelo experimental en la evaluación de compuestos xenobióticos,” *Pädi Boletín Científico Ciencias Básicas e Ing. del ICBI*, vol. 10, no. 19, pp. 61–65, 2022, doi:10.29057/icbi.v10i19.8870.
- [27] C. Martins and P. M. Costa, “Technical Updates to the Comet Assay In Vivo for Assessing DNA Damage in Zebrafish Embryos from Fresh and Frozen Cell Suspensions,” *Zebrafish*, vol. 17, no. 3, pp. 220–228, 2020, doi: 10.1089/zeb.2020.1857.

- [28] B. Torres, Leidy., Osorio, Ketty and Murillo B, “Efectos genotóxicos de los contaminantes ambientales, en peces de importancia comercial del río Magdalena, en el departamento del Tolima,” *Rev. tumbaga*, vol. 1, no. 9, pp. 21–53, 2014.
- [29] M. Peñalosa, Mercedes., M. Camargo., and J. Palacio. “Genotoxicidad del cloruro de mercurio en dos especies ícticas (*Prochilodus magdalenae* y *Oreochromis* sp.” *Actual. biológicas*, vol. 25, no. 79, pp. 105–111, 2003.
- [30] A. Canedo and T. L. Rocha, “Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends,” *Sci. Total Environ.*, vol. 762, p. 144084, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144084.
- [31] D. Matoulek, V. Borůvková, K. Ocalewicz, and R. Symonová, “GC and Repeats Profiling along Chromosomes—The Future of Fish Compositional Cytogenomics,” *Genes (Basel)*, vol. 12, no. 1, p. 50, Dec. 2020, doi: 10.3390/genes12010050.
- [32] M. Costantini, F. Auletta, and G. Bernardi, “Isochore patterns and gene distributions in fish genomes,” *Genomics*, vol. 90, no. 3, pp. 364–371, Sep. 2007, doi: 10.1016/j.ygeno.2007.05.006.
- [33] C. Melodelima and C. Gautier, “The GC-heterogeneity of teleost fishes,” *BMC Genomics*, vol. 9, no. 1, p. 632, 2008, doi: 10.1186/1471-2164-9-632.
- [34] K. P. Dobrinski, K. H. Brown, J. L. Freeman, and C. Lee, “Molecular Cytogenetic Methodologies and a BAC Probe Panel Resource for Genomic Analyses in the Zebrafish,” 2011, pp. 237–257.
- [35] D. Huber, L. Voith von Voithenberg, and G. V. Kaigala, “Fluorescence in situ hybridization (FISH): History, limitations and what to expect from micro-scale FISH?,” *Micro Nano Eng.*, vol. 1, pp. 15–24, 2018, doi: 10.1016/j.mne.2018.10.006.
- [36] J. D. Tucker, “Chromosome translocations and assessing human exposure to adverse environmental agents,” *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 51, no. 8–9, pp. 815–824, Oct. 2010, doi: 10.1002/em.20561.
- [37] J. L. Shepard et al., “A mutation in separase causes genome instability and increased susceptibility to epithelial cancer,” *Genes Dev.*, vol. 21, no. 1, pp. 55–59, Jan. 2007, doi: 10.1101/gad.1470407.
- [38] C. Lee and A. Smith, “Molecular Cytogenetic Methodologies and a Bacterial Artificial Chromosome (BAC) Probe Panel Resource for Genomic Analyses in Zebrafish,” pp. 241–254, 2004.

Tabla suplementaria 1: Protocolo Citogenética de bandas - Bando GTG para pez cebra (*Danio rerio*)

ETAPA	DESCRIPCIÓN
1. Preparación	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vortexar la muestra por 3 segundos, posteriormente centrifugar a 3.000 rpm por 5 minutos. 2. Eliminar sobrenadante y adicionar Carnoy. 3. Repetir el paso 1. 4. Indispensable generar una temperatura cálida al ambiente de trabajo en el laboratorio. Ayudarse con planchas de calentamiento y baño maría.
2. Extendido	<ol style="list-style-type: none"> 1. Resuspender. Tomar doce (12) microlitros de suspensión celular en fijador Carnoy (metanol : ácido acético 3:1) y dejarlos caer sobre un portaobjetos seco desde una altura de 1 cm y con grado de inclinación de 45°. Depositar los portaobjetos con los extendidos cromosómicos sobre baño serológico a 68°C y 90% de humedad, hasta la evaporación total del fijador Carnoy. 2. Realizar observación al microscopio con el fin de comprobar el éxito del extendido.
3. Bando GTG	<ol style="list-style-type: none"> 1. Llevar la lámina al horno para realizar el proceso de envejecimiento por 2 horas a 82°C. 2. Agregar en un copling 108 mL de agua destilada y 12 mL de 20xSSC, depositarlo en baño maría a 62°C por 30 minutos. Lavar con abundante agua y dejar secar. 3. Preparar Tripsina: 12 mL de agua destilada y agregar 12 mL de Tripsina, conservar en nevera. 4. Proporcionar calor a la lámina por medio de la plancha de calentamiento e inmediatamente introducirla en Tripsina fría por 3-4 segundos con el fin de generar el choque térmico. Lavar con abundante agua y dejar secar. 5. Se debe realizar una observación preliminar al microscopio para observar si la lámina requiere más tiempo en Tripsina, si es así, repetir el paso 3.4. 6. Preparar el colorante Giemsa para realizar la tinción. Preparación: 0.2 mL de Giemsa, 0.2 mL de tampón Sorensen y 4.6 mL de agua destilada. 7. Adicionar 10 mL del colorante Giemsa previamente preparado sobre la lámina formando un cojín y evitando la formación de burbujas. Dejar actuar por 10 minutos. Lavar con abundante agua. 8. Al día siguiente, agregar cubreobjeto a la lámina y sellar con Entellan. Dejar reposar.
4. Lectura de Metafasas	Realizar la lectura y análisis de las metafases.

Tabla 2: Protocolo técnica Hibridación in situ por Fluorescencia (FISH) para pez cebra (*Danio rerio*)

ETAPA	DESCRIPCIÓN
1. Preparación	<ol style="list-style-type: none"> 1.1 Vortexar las suspensiones celulares por 3 segundos, posteriormente centrifugar a 3.000 rpm por 5 minutos. Eliminar sobrenadante y adicionar Carnoy. 1.2 Resuspender. Tomar doce (12) microlitros de la suspensión celular en fijador Carnoy (metanol : ácido acético 3:1) y dejarlos caer sobre un portaobjetos seco desde una altura de 1 cm y con grado de inclinación de 45°. Depositar los portaobjetos con los extendidos cromosómicos sobre baño serológico a 68°C y 90 % de humedad, hasta la evaporación total del fijador Carnoy. El baño serológico se utiliza para proporcionar la humedad y la temperatura adecuada para el secado de las células y la propagación de los cromosomas. 1.3 Realizar observación al microscopio con el fin de comprobar el éxito del extendido. 1.4 Seleccionar la zona a hibridar, la cual debe estar conformada por una gran cantidad de núcleos interfásicos y/o metafases.
2. Pre-Hibridación	<ol style="list-style-type: none"> 2.1 Preparar las soluciones a usar para la prehibridación, incluyendo: un copling con solución 2xSSC, un copling conteniendo etanol al 70 %, un copling conteniendo etanol al 85 % y un copling conteniendo etanol al 100 %. 2.2 Depositar los portaobjetos conteniendo las suspensiones celulares en la solución 2xSSC por 2 minutos. Posteriormente retirar y dejar secar. 2.3 Pasado el tiempo en solución 2xSSC, depositar las láminas en cada uno de los etanoles (70 %, 85 % y 100 %) por 2 minutos cada uno.
3. Hibridación	<ol style="list-style-type: none"> 3.1 Es indispensable manejar un ambiente con mínimo nivel de luz debido al uso de la sonda. 3.2 Sacar la sonda NOR del congelador mínimo 30 minutos antes de su uso. Luego, vortexar y centrifugar la sonda por 3 segundos. 3.3 Tomar 3 µL de la sonda con micropipeta, y depositarla sobre la zona demarcada previamente (paso 1.4) en la lámina portaobjetos conteniendo las suspensiones celulares. Para evitar la formación de burbujas, se recomienda realizar este paso de manera lenta y cuidadosa. Cubrir con cubreobjetos. Dejar reposar en oscuridad. 3.4 Sellar con pegante de goma los bordes del cubreobjetos. Dejar secar en oscuridad. 3.5 Depositar las láminas portaobjetos conteniendo las suspensiones celulares en el equipo ThermoBrite (equipo usado para llevar a cabo los pasos de desnaturalización e hibridación de la sonda). Seleccionar el programa correspondiente a la sonda, que incluye: desnaturalización por 2 minutos a 75°C e hibridación a 37°C durante 20 horas.
4. Post-Hibridación	<ol style="list-style-type: none"> 4.1 Es indispensable manejar un ambiente con mínimo nivel de luz debido al uso de la sonda. 4.2 Pasado el tiempo de hibridación, retirar las láminas del equipo ThermoBrite y remover el pegante de goma con ayuda de unas pinzas. Luego, depositar las láminas en buffer 2xSSC por 5 minutos con el objetivo de retirar el cubreobjetos. 4.3 Realizar los lavados de astringencia de la siguiente manera: depositando las láminas en solución 0,4xSSC a 72°C por 2 minutos, luego pasarlas por solución 2xSSC + NP40 por 30 segundos, y finalizar con los pasos por los etanoles (70 %, 85 % y 100 %) por 1 minuto en cada alcohol. 4.4 Sacar las láminas con las suspensiones celulares del último etanol y dejarlas secar en oscuridad. 4.5 Cuando las láminas estén secas, agregar 3 µL de DAPI sobre la zona hibridada usando micropipeta. Colocar el cubreobjetos y sellar con esmalte.
5. Lectura	<ol style="list-style-type: none"> 5.1 Dejar las láminas en la nevera a 4°C por un mínimo de 10 minutos para asegurar que el DAPI se extienda de manera uniforme. 5.2 Realizar la lectura de un mínimo de 100 núcleos interfásicos usando un microscopio de fluorescencia. 5.3 Es indispensable manejar un ambiente con mínimo nivel de luz.