

**HISTOLOGÍA HEPÁTICA DEL PEZ CÍCLIDO *Aequidens metae* COMO
BIOMARCADOR DE EXPOSICIÓN A UN HIDROCARBURO AROMÁTICO POLI-
CÍCLICO**

DIANA CAROLINA CIFUENTES GUERRERO

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS ANIMALES
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
VILLAVICENCIO
2020**

**HISTOLOGÍA HEPÁTICA DEL PEZ CÍCLIDO *Aequidens metae* COMO
BIOMARCADOR DE EXPOSICIÓN A UN HIDROCARBURO AROMÁTICO POLI-
CÍCLICO**

DIANA CAROLINA CIFUENTES GUERRERO

**Proyecto de Investigación (EPI) en modalidad investigativa presentado al
programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia como requisito parcial para
obtener el título de Médico Veterinario y Zootecnista.**

**Grupo de Investigación en Biotecnología y Toxicología Acuática y Ambiental
BioTox**

**Yohana María Velasco Santamaría, PhD
Orientadora**

**Wilson Corredor Santamaría, cPhD
Co-orientador**

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS ANIMALES
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTEENIA
PROPUESTA DE TRABAJO DE GRADO
2020**

NOTA DE ACEPTACION

Aprobado

MV. PhD Yohana María Velasco Santamaria
FIRMA DE DIRECTORA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primera instancia a mi directora de esta pasantía investigativa, la Dra. Yohana María Velasco Santamaria y mi codirector Wilson Corredor Santamaria, por su orientación, conocimiento, dedicación y apoyo que me han brindado a este trabajo, bajo una dirección firme brindándome todo lo necesario para terminarla con éxito. Así mismo agradezco al Grupo de Investigación en Biotecnología y Toxicología Acuática y Ambiental BioTox por brindarme su acompañamiento y conocimiento.

Agradezco también a la Universidad de los Llanos mi alma mater y en especial a esos docentes que me aportaron en mi crecimiento personal, académico y profesional durante mi estancia en la universidad.

Gracias a mis padres por brindarme su amor, paciencia, comprensión y apoyo moral, ya que sin esto no hubiera sido posible lograrlo, por eso este trabajo también es el suyo. A todos, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	4
1.OBJETIVOS	8
1. OBJETIVO GENERAL	8
2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	8
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
3. MARCO TEÓRICO	9
3.1. Hidrocarburos policíclicos aromáticos	9
3.1.1. Benzo (a) pireno	10
3.2. <i>Aequidens metae</i>	11
3.2.1. Histología hepática en peces expuestos a contaminantes	11
4. METODOLOGÍA REALIZADA.....	12
5. ACTIVIDADES REALIZADAS	13
5.1. Adaptación de los peces luminosa (<i>Aequidens metae</i>).....	13
5.2. Exposición de los peces luminosa (<i>Aequidens metae</i>)	14
5.3.1. Análisis histológico	16
6. ANALISIS ESTADISTICO	17
7. RESULTADOS Y DISCUSION	17
8. CONCLUSIONES	21
9. RECOMENDACIONES	21
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

LISTA DE FIGURAS

- Fotografía 1:** Identificación de los acuarios con números de tratamientos y replicas y concentraciones respectivas del hidrocarburo aromático policíclico (Benzo(a)pireno). Fuente: grupo de investigación BioTox 13
- Fotografía 2:** Inyección de las concentraciones respectivas de BaP vía Intraperitoneal, pesaje del hígado muestreado. Fuente: grupo de investigación BioTox 14
- Fotografía 3:** Procedimiento anestésico de los especímenes, medición y pesaje y toma de muestras. Fuente: grupo de investigación BioTox..... 15
- Fotografía 4 y 5:** Toma de muestras de cada tratamiento colectando hígado, bilis, y sangre, a los 3 días y a los 10 días, medición de longitud y peso de los peces. Fuente: grupo de investigación BioTox 16

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. <i>Monitoreo de parámetros fisicoquímicos durante el ensayo de exposición de luminosa Aequidens metae vía intraperitoneal a tres concentraciones de BaP (n=6), durante 10 días.</i>	17
Tabla 2. <i>Área, diámetro, número de hepatocitos y grado de cambios en los tejidos (GCT) en luminosa Aequidens metae expuestos vía intraperitoneal a tres concentraciones de BaP (n=6), con muestreos a las 72 horas y 10 días.</i>	20

1.OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la histología hepática de ejemplares de luminosa (*Aequidens metae*) expuestas a un hidrocarburo aromático policíclico (HAP).

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar posibles alteraciones histológicas en hígados de ejemplares de luminosa (*Aequidens metae*) expuesta a un hidrocarburo aromático policíclico (HAP).
- Cuantificar variaciones en la morfología de las células de tejido hepático de luminosa (*Aequidens metae*) expuesta a un hidrocarburo aromático policíclico (HAP).
- Participar y colaborar en diferentes procesos y proyectos de investigación realizados por el Grupo de Investigación en Biotecnología y Toxicología Acuática y Ambiental (BioTox), adscrito a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad de los Llanos.

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Este trabajo se realizó con el fin de evaluar las modificaciones y variaciones de la morfología histológica hepática de los peces de genero *Aequidens metae* ante la exposición al hidrocarburo aromático policíclico benzo (a) pireno. La región de la Orinoquia es una de las zonas de mayor interés en cuanto a producción petrolera en el país, cuenta con aproximadamente 220.000 km² de extensión de yacimientos de petróleo que representan el 68.9% de producción total de crudo en Colombia (Avellaneda Cusarúa, 2013); siendo esta unas de las fuentes de producción de HAPs, además de otras fuentes como la quema de combustibles, la combustión incompleta del petróleo, la destilación de madera, el escurrimiento de pavimentos asfálticos, las emisiones vehiculares, y los derrames de petróleo (Vives et al., 2001).

Es prioritario realizar monitoreo ambiental con especies nativas de la región en virtud que la gran expansión de la extracción de petróleo en sus diferentes formas ha afectado el medio ambiente en aspectos como la remoción de cobertura vegetal, que como consecuencia genera una inestabilidad de las cuencas y la oferta ambiental del agua, alteraciones de los patrones naturales de drenaje que en sus casos más graves llevan a procesos de erosión de grandes áreas de humedales, contaminación de las aguas superficiales y acuíferos por deficiencia del tratamiento de

estas, la salinización de suelos y bioacumulación de residuos a través de diferentes mecanismos como reacción ácido-base y de óxido-reducción, los cuales pueden movilizarse del suelo a napas freáticas (Avellaneda Cusarúa, 2013). La contaminación por este tipo de sustancias es cada vez mayor afectando la flora y la fauna, ya que dependiendo de su estructura orgánica y los niveles de exposición sus metabolitos pueden causar efectos tóxicos, mutagénicos y/o carcinogénicos en peces y otros vertebrados, incluyendo al ser humano, es por esto que resulta importante el monitoreo ambiental debido al incremento potencial de la contaminación por HAPs (Monteiro et al., 2000).

Basado en estos antecedentes se evidencia la falta de monitoreo ambiental eficiente ante la presencia de HAPs en los cuerpos de agua y acuíferos, siendo una forma de monitorearlos la histología hepática.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Hidrocarburos policíclicos aromáticos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son fusiones de varios anillos aromáticos derivados del benceno. Debido a sus propiedades químicas, en la actualidad muchos de ellos están catalogados como sustancias contaminantes y cancerígenas. Se conocen más de 100 HAPs diferentes ya que existe una elevada cantidad de isómeros, entre estos encontramos el naftaleno, fluoreno, antraceno, fenantreno, fluoranteno, el de importancia en este estudio benzo (a) pireno (BaP), entre otros (Vives et al., 2001).

Los HAPs tienen diferentes fuentes de procedencia natural o antropogénicas, tales como el petróleo, la combustión de combustibles, la combustión incompleta del petróleo, la destilación de manera, el escurrimiento de pavimentos asfálticos, las emisiones vehiculares, y los derrames de petróleo, las fuentes naturales como incendios forestales, erupciones volcánicas que su emisión es mínima comparada a las que proceden de la intervención del ser humano (Mastandrea et al., 2005).

El petróleo y sus derivados produce una movilización de HAP de 69.4 millones de toneladas anuales, de las cuales 3618 toneladas son de benzo(a) pireno por año. Se tiene una estimación que aproximadamente 6 millones de ton³ por año de HAP se producen a partir del crudo y destilados de petróleo, los cuales entran en el ambiente acuático (Salazar, 2008).

Según (Benavides, 2006) los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos, como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida pueden ser procesos más o menos lentos lo que ocasiona una mayor toxicidad, ya que estos por sus cadenas cíclicas de

uno o más anillos bencénicos llegan hacer poco polares o no polares, por lo cual no pueden disolverse en agua.

De la toxicocinética de los compuestos de los HAPs no existe mucha información con excepción del benzo(a)pireno, cuya absorción en mamíferos oscila entre un 12% y un 99% en función de la especie y de la dosis de ingesta, ya que es liposoluble, esto facilita su absorción a través de las membranas, este se puede absorber por el intestino pero también puede ingresar por vías respiratorias, luego que BaP ingresa por el intestino hasta el enterocito este incrementa la captación por citocromo P450 que favorece su paso hasta la membrana baso lateral es decir que los hidrocarburos de bajo peso molecular son absorbidos en mayor medida que los de mayor peso molecular y su metabolismo es básicamente hepático, luego de que son absorbidos se distribuyen por casi todos los órganos, incluso pueden traspasar la barrera placentaria, su principal ruta de eliminación es la bilis (Pérez-Morales López et al., 2016).

La alta exposición de los HAPs en suelos genera varios inconvenientes debido a la persistencia y pueden inducir genotoxicidad asociada con el aumento de tamaño de la molécula, el número creciente de anillos de benceno y la tasa de biodegradación, por ejemplo, el fenantreno tiene una vida media de 16 hasta 126 días.(Quijano et al., 2014)

3.1.1. Benzo (a) pireno

BaP es uno de los hidrocarburos más estudiados, se compone de 5 anillos cuya fórmula es $C_{20}H_{12}$, este se produce por combustión incompleta a temperaturas de 300° y 600°C, es altamente toxico debido a su alto nivel de mutagenicidad y carcinogenicidad, el BaP ya se consideraba cancerígeno en el siglo XVIII en Inglaterra.

BaP pertenece a la clase de los benzopirenos por presentar un anillo benceno unido a una molécula de pireno, su peso molecular es 252.31 g/mol, posee una densidad de 1.24 g/cm³, solubilidad en agua de 0.11 mg/L, su punto de fusión 179°C y punto de ebullición 495°C. Este hidrocarburo a nivel hepático genera intermediarios reactivos como BaP 7,8 dihidrodiol-9, 10 epóxido que causa hepatotoxicidad e inmunotoxicidad (Miller & Ramos, 2001).

Teniendo en cuenta las características de este hidrocarburo aromático policíclico que es altamente tóxico, mutagénico y/o carcinogénico en peces a nivel hepático se ha reportado una incidencia alta de tumores (Patrocinate et al., 2015).

En un estudio fueron expuestos juveniles de la especie *S. sanegalensis* a cadmio y BaP, de forma individual y en combinación, a nivel histológico el hígado presentó alteraciones en el parénquima, aumento de células como los macrófagos hepáticos específicamente células de Kupfer que ocasionaron una compresión en los hepato-

citos, incremento de inclusiones en células como vacuolas lipídicas que dificultó observar los límites celulares, además encontraron necrosis focales y aumento de células apoptóticas (Costa et al., 2010).

Otras alteraciones histológicas que se pueden presentar a nivel hepático por la exposición a BaP, incluyen signos de degeneración, como cariopicnosis, cariorrexis, signos de aumento de división celular, depósitos de glucógeno o de grasa, entre otros. Adicionalmente, en estudios que emplearon la aplicación vía de administración intraperitoneal de BaP y alimentación forzada, fueron reportados cambios degenerativos en el primer día de exposición, al segundo día se observó desorden del parénquima hepático y aumento del retículo endoplasmático liso de los hepatocitos (Lemaire-Gony & Lemaire, 1992).

3.2. *Aequidens metae*

Se conoce como luminosa, viejita, mojarrita pertenece a la familia Cichlidae del orden de los Perciformes. Habita agua dulce con un promedio de pH de 4.8 – 6.0, en zona tropical con temperaturas de 24° a 30°C, originaria del río Meta en la cuenca del Orinoco, Colombia, que posee aguas blandas y con buen drenaje, esta especie adhiere sus posturas en la superficie de las rocas, troncos u hojas sumergidas, las cuales son vigiladas por los machos (Hernández-Acevedo et al., 2015).

3.2.1. Histología hepática en peces expuestos a contaminantes

El hígado en los peces realiza funciones que en los mamíferos son ejecutadas de manera separada en hígado y páncreas. Se localiza en la región media y anterior de la cavidad abdominal, se divide en lóbulos, está constituido por estroma y parénquima, en donde el estroma es el tejido de sostén y cuenta con una capsula que recubre el órgano, en el parénquima se localizan los hepatocitos que cumplen una función endocrina y el sistema que drena la bilis que cumplen la función exocrina (Torres et al., 2010).

La mayoría de los residuos contaminantes que llegan a los cuerpos de agua provienen de las actividades humanas, dependiendo de su naturaleza, estos permiten la acumulación de varios xenobióticos, como pesticidas, metales tóxicos, HAPs, bifenilos policlorados etc. como se muestra en un estudio realizado con especies nativas para observar los cambios hematológicos e histológicos ante exposición de contaminantes del río Ocoa que recibe las aguas residuales domésticas e industriales de la ciudad de Villavicencio-Meta, en donde observaron alteraciones hepáticas que fueron correlacionadas con los resultados hematológicos y genotóxicos que se desarrollaron, encontraron disminución del recuento de eritrocitos, de la concentración de hemoglobina y del hematocrito que generaron alteraciones inflamatorias, y

celulares como hiperplasia inflamatoria laminar e interlaminar y aneurismas de elevación epitelial, estos cambios hematológicos se asociaron con las anomalías hepáticas, tales como picnosis, vacuolización, infiltración linfocítica, y a nivel genotóxico en eritrocitos periféricos con presencia de micronúcleos que se asociaron con peroxidación lipídica, teniendo en cuenta que ante el daño en la membrana de la célula lipídica, el ADN se expone generando mutaciones irreversibles por la pérdida de hidrogeno en uno de nucleótidos de la secuencia del ADN (Corredor-Santamaría et al., 2016).

Los estudios de monitoreo ambiental han evaluado diferentes factores de contaminación ambiental que afectan los cuerpos y ecosistemas acuáticos, entre estos, se evaluó los efectos tóxicos del surfactante Cosmoflux, el cual hace parte de los químicos utilizados en fumigación de cultivos ilícitos en Colombia, fue expuesto el pez cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) a diferentes concentraciones 0.17, 0.34, 0.68, 1.36, 2.72 mg/l, las cuales evidenciaron la presencia de alteraciones hepáticas como vacuolización lipídica, picnosis de los hepatocitos y congestión, entre otras (Rondón/Barragán et al., 2007).

Finalmente, se ha asociado la inducción de neoplasias a la exposición a HAPs, los peces tienen enzimas que participan en la biotransformación de compuestos xenobióticos durante las fases I y II, las cuales incluyen la Citocromo P4501A y la glutatión-S-transferasa, estas pueden catalizar la producción de metabolitos cancerígenos reactivos para el ADN (Vogelbein & Unger, 2006), además se han vinculado diversas lesiones hepatocelulares como presencia de eosinófilos, basófilos, células claras, adenoma hepatocelular, carcinomas, hepatoblastomas a la exposición crónica a estos compuestos (Vogelbein & Unger, 2006).

4. METODOLOGÍA REALIZADA

Este trabajo se realizó en la Universidad de los Llanos sede Barcelona km 12 vía puerto López en el Laboratorio de Toxicología y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales y en el marco de las actividades realizadas por el grupo de investigación en Biotecnología y Toxicología Acuática y Ambiental (BioTox).

Material biológico: para este fin se emplearon ejemplares adultos de *Aequidens metae*, los cuales fueron obtenidos de las piscícolas de la región.

Adaptación y exposición: los ejemplares se ubicaron aleatoriamente en acuarios de vidrio de 20 L de capacidad, se impuso un periodo 30 días de adaptación a las condiciones de confinamiento, se mantuvieron los parámetros fisicoquímicos de agua controlados, manteniendo estables las condiciones ambientales. Los animales se alimentaron con concentrado comercial diariamente durante la fase de aclimatación.

Tanto en la fase de aclimatación como de exposición se determinaron las variables fisicoquímicas del agua como pH, temperatura, conductividad, dureza, oxígeno disuelto y fosforo a través de una sonda multiparamétrica YSI. Los parámetros fisicoquímicos se evaluaron cada tercer día durante la fase experimental. Tanto en la fase de aclimatación como de exposición, se realizarán recambios del 25% de agua en cada uno de los acuarios (sistema semi-estático).

Concluidos los 30 días de adaptación, los peces fueron expuestos vía intraperitoneal a diferentes concentraciones de benzo (a) pireno (0,1; 1.0 y 10 µg/g de peso vivo) en única dosis. El HAP se disolvió en aceite vegetal previo a la inyección.

La selección de estas concentraciones se basó en la literatura existente cuyos resultados demostraron inducción positiva de CYP1A1, así como la actividad EROD correspondiente.

5. ACTIVIDADES REALIZADAS

5.1. Adaptación de los peces luminosa (*Aequidens metae*)

Se realizó la adaptación de los peces luminosa (*Aequidens metae*) obtenidos de las piscícolas de la región; durante 30 días en los acuarios de vidrio de 20 L, donde se dividieron en tres grupos control (control negativo, sin inyección; control vehículo, con inyección del aceite; y control positivo, con inyección de β-naftoflavona el cual es inductor de la actividad EROD) y tres grupos expuestos a BaP), cada grupo con tres replicas, (n=12 por tratamiento), para su identificación se marcó cada acuario con el número de tratamiento y replica con la concentración correspondiente , como se muestra en la Fotografía 1.



Fotografía 1: Identificación de los acuarios con números de tratamientos y replicas y concentraciones respectivas del hidrocarburo aromático policíclico (Benzo(a) pireno). Fuente: grupo de investigación BioTox

5.2. Exposición de los peces luminosa (*Aequidens metae*)

Concluido el periodo de adaptación de los peces, aleatoriamente fueron expuestos al hidrocarburo aromático policíclico a las concentraciones establecidas, benzo (a) pireno (0,1 $\mu\text{g/g}$ – 1 $\mu\text{g/g}$ – 10 $\mu\text{g/g}$), se distribuyeron los peces del grupo control negativo, del grupo vehículo fue inyectado con (5 $\mu\text{l/g}$) del aceite vegetal; y el grupo control positivo (fue inyectado con (50 $\mu\text{g/g}$) de β -naftoflavona, el periodo de exposición fue de 10 días y el muestreo se distribuyó así:

Día 0: Se capturan los peces y se sumergen en solución anestésica con 2-fenoxietanol (400 ppm), tras presentar signos de plano anestésico como perdida del eje de nado se procede a la inyección parenteral de la concentración correspondiente de BaP disuelto en aceite por vía intraperitoneal, durante el procedimiento se realizó el registro del peso y longitud de cada animal, y la medición de parámetros físico-químicos como temperatura, oxígeno disuelto, pH, nitritos, nitratos y amonio. De cada uno de los ejemplares, se obtuvo el hígado, la bilis y sangre periférica.



Fotografía 2: Inyección de las concentraciones respectivas de BaP vía Intraperitoneal, pesaje del hígado muestreado. Fuente: grupo de investigación BioTox



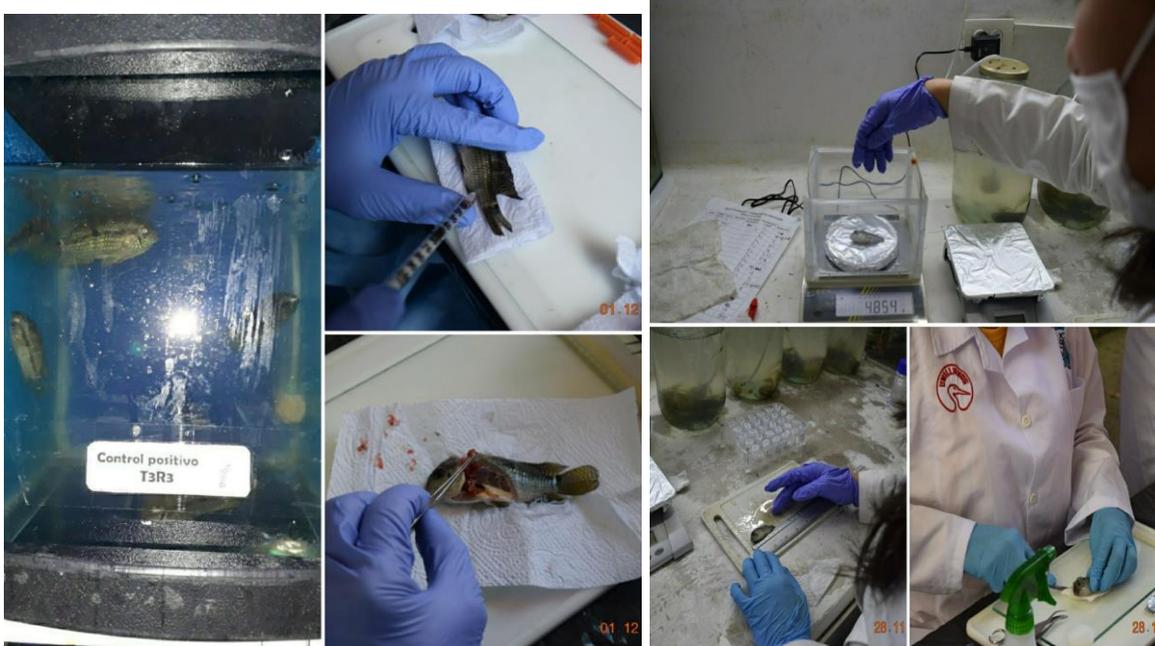
Fotografía 3: Procedimiento anestésico de los especímenes, medición y pesaje y toma de muestras. Fuente: grupo de investigación BioTox

5.3. Extracción de tejido hepático

Para la extracción del tejido hepático, los peces una vez anestesiados con 2-fe-noxietanol (400 ppm), fueron insensibilizados por corte medular, los individuos fueron pesados y medidos, posteriormente a través de necropsia se extrajo el tejido y se dividió en dos porciones, una de ellas fue fijada en solución de formaldehido tamponado al 10% por 24 horas.

Se realizaron muestreos a los 0, 3, y 10 días de exposición. A la hora cero, se sacrificaron 12 peces en total. En cada día de monitoreo (3 y 10), se sacrificaron 6 individuos por tratamiento.

En cada muestreo, el hígado extraído de cada animal fue pesado, también se colectó la bilis y sangre periférica, todos los animales fueron medidos y pesados y simultáneamente, fueron medidos los parámetros físico-químicos del agua.



Fotografía 4 y 5: Toma de muestras de cada tratamiento colectando hígado, bilis, y sangre, a los 3 días y a los 10 días, medición de longitud y peso de los peces. Fuente: grupo de investigación Bio-Tox

5.3.1. Análisis histológico

Las muestras fijadas fueron sometidas a concentraciones ascendentes de etanol (70-99%) antes de la inclusión en parafina. Los tejidos se cortaron y seccionaron (3 μ m) en un micrótopo de rotación y teñidos posteriormente con hematoxilina y eosina (H&E). Para la visualización se utilizó un microscopio óptico (Zeiss), para la captura de imágenes se utilizó una cámara adaptada al computador.

La histología hepática se clasificó semi-cuantitativamente en función de la gravedad de las lesiones y la distribución (focal, multifocal, difusa). La presencia de alteraciones hepáticas en hepatocitos tanto en el citoplasma como en el núcleo, como pleomorfismo, degeneración, vacuolización, hiperemia y pinocitosis nuclear, se definieron de la siguiente manera: **0**=No observado, **1**=Leve, **2**=Moderado, **3**=cambios severos que implican alteración significativa de apariencia y arquitectura.

La aparición de alteraciones histopatológicas del hígado se determinó de forma semicuantitativa, a partir del grado de cambio tisular (DTC), que se basó en la gravedad de las lesiones. Donde las alteraciones en cada órgano se clasificaron en etapas progresivas de daño tisular.

El valor DTC se calculó para cada animal utilizando la siguiente fórmula: $DTC = (1X SI) + (10X SII) + (100X SIII)$, donde I, II y III corresponden al número de estadios de la suma del número de alteraciones para cada estadio particular. Los valores del DTC entre 0 y 10 indican el funcionamiento normal de los órganos; los valores entre

11 y 20 indican un daño leve a los órganos; entre 21 y 50 indican cambios moderados en los órganos; y entre 50 y 100 indican un daño grave a los órganos; y los valores superiores a 100 indican un daño irreparable a los órganos (Poleksić & Mitrović-Tutundžić, 1994).

El área, diámetro y número de núcleos de hepatocitos se determinaron en un área de $100\mu\text{m}^2$ por sección (con duplicado para cada pez) con un aumento de 400x. Estas mediciones del tamaño de las células se realizaron manualmente utilizando ImageJ Software V39B (Wayne Rasban, INH (Instituto Nacional de Salud, EE. UU) con una calibración previa empleando una retícula de 1 mm de longitud.

6. ANALISIS ESTADISTICO

Las variables cuantitativas fueron sometidas a pruebas de homogeneidad (Levene's) y normalidad (Kolmogórov-Smirnov). Posteriormente, se realizó un análisis de varianza de dos vías para comprobar las diferencias significativas entre los grupos de control y los grupos tratados en los tiempos de monitoreo (3d y 10d). Se determinó el coeficiente de variación para evitar los errores estadísticos de tipo III, y se realizó un análisis ANOVA de dos vías (DTC, área, diámetro y número de núcleos de hepatocitos) con post test de tukey para comparar los valores medios. Los datos fueron rankeados cuando no se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad, después de las transformaciones apropiadas, el nivel de significancia empleado fue $p < 0,05$.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

Durante los diferentes monitoreos, los parámetros de calidad de agua no presentaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los tratamientos durante los 10 días del ensayo. La temperatura del agua fluctuó entre 25 y 27 °C, el oxígeno disuelto entre 0.33 y 6.28 mg/L, el pH entre 6.40 y 7.61, los nitritos entre 0.08 y 0.42 mg/L, los nitratos entre 0.08 y 1.67 mg/L y el amonio entre 0.08 y 1.00 mg/L (tabla 1). Lo que permite corroborar que durante el ensayo las condiciones de calidad del agua no fueron alteradas por los detritos generados por los peces expuestos a HAPs, BNF o al vehículo de administración de los HAPs.

Tabla 1. Monitoreo de parámetros fisicoquímicos durante el ensayo de exposición de luminosa *Aequidens metae* vía intraperitoneal a tres concentraciones de BaP ($n=6$), durante 10 días.

Día muestreo	Tratamiento	Parámetro de calidad de agua					
		Temperatura	pH	Oxígeno disuelto	NO ₂	NO ₃	NH ₃
0		25.79±0.06	7.12±0.48	5.52±0.12	0.08±0.08	0.00±0.00	0.08±0.08
3	Control negativo	26.00±0.18	7.24±0.39	6.07±0.32	0.17±0.17	0.00±0.00	1.00±0.25
7		25.98±0.04	6.78±0.28	5.85±0.07	0.25±0.14	1.67±0.83	0.50±0.14
10		26.41±0.04	7.19±0.08	0.33±0.17	0.33±0.08	0.00±0.00	0.17±0.17
0		26.26±0.17	6.40±0.30	5.86±0.12	0.04±0.00	0.08±0.00	0.08±0.00
3	Control solvente	26.32±0.19	7.01±0.31	5.68±0.13	0.08±0.08	0.00±0.00	0.08±0.00
7		26.73±0.18	7.46±0.05	5.76±0.10	0.17±0.01	0.83±0.83	0.33±0.08
10		27.24±0.15	7.23±0.33	5.70±0.21	0.33±0.17	1.67±1.67	0.58±0.08
0		26.80±0.19	6.91±0.25	5.27±0.24	0.08±0.08	0.00±0.00	0.08±0.08
3	B-Naftoflavona	26.21±0.42	7.20±0.27	5.13±0.17	0.08±0.08	0.00±0.00	0.67±0.22
7		26.29±0.12	7.07±0.30	5.48±0.20	0.08±0.08	1.67±0.83	0.42±0.22
10		26.79±0.19	7.29±0.12	5.88±0.13	0.33±0.17	0.83±0.83	0.08±0.08
0		26.65±0.07	7.32±0.29	5.78±0.15	0.08±0.08	0.08±0.08	0.08±0.08
3	BaP 0,1 µg/g	26.58±0.12	7.11±0.23	5.93±0.12	0.08±0.08	0.83±0.83	0.83±0.08
7		26.96±0.13	6.84±0.23	5.80±0.19	0.17±0.08	0.83±0.83	0.67±0.08
10		27.15±0.45	7.42±0.22	5.73±0.19	0.33±0.17	0.83±0.83	0.17±0.17
0		25.95±0.24	7.16±0.21	6.28±0.13	0.08±0.08	0.00±0.00	0.08±0.08
3	BaP 1,0 µg/g	25.97±0.12	7.42±0.24	5.65±0.12	0.08±0.08	0.83±0.83	0.83±0.17
7		26.26±0.11	6.86±0.15	5.82±0.11	0.17±0.08	1.67±1.67	0.58±0.17
10		26.51±0.18	6.98±0.31	6.06±0.11	0.42±0.08	1.33±0.83	0.33±0.17

0		26.28±0.12	7.48±0.21	6.07±0.18	0.08±0.08	0.08±0.08	0.00±0.00
3		26.21±0.23	7.61±0.14	6.18±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00	0.75±0.00
	BaP 10 µg/g						
7		26.25±0.18	7.60±0.01	6.17±0.10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.58±0.17
10		26.04±0.11	7.44±0.17	6.28±0.16	0.33±0.17	0.83±0.83	0.17±0.17

Con respecto al análisis histológico, el tejido hepático de los peces del grupo control negativo y vehículo de los HAPs no mostró diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$) en ninguna de las variables respuesta evaluadas. Esto indica que los peces se mantuvieron en condiciones adecuadas de calidad de agua y no se manifestaron alteraciones morfológicas por estrés inducidas por la manipulación de los ejemplares de *A. metae* durante el ensayo. Las alteraciones hepáticas que se observaron fueron en el número de hepatocitos, diámetro, área, también se tomó en cuenta el índice DTC (grado de cambio de los tejidos). El grupo expuesto a las concentraciones mínimas de BaP (0.1µg/g-1.0µg/g) mostraron un DTC entre 11 a 20 a las 72 horas indicando un cambio en los tejidos, con daños leves, por lo cual los cambios morfológicos no fueron muy significativos en estos tratamientos (Tabla 2).

La mayor incidencia de alteraciones hepáticas se observó en los ejemplares de *A. metae* expuestos a la mayor concentración de BaP (10 µg/g) en los muestreos realizados a las 72 h de exposición con cambios moderados en el tejido según su resultado de DTC que estaba en 21 y 50, los núcleos de los hepatocitos se observaron con mayor área y un aumento de número de los mismos, con un daño moderado del tejido.

Los cambios del diámetro de los núcleos de los hepatocitos se pueden ser por una reacción de estrés, también es un indicativo del aumento en la activación metabólica del hígado por la exposición del hidrocarburo policíclico aromático BaP (Marcon et al., 2015), en varios estudios se ha demostrado que las alteraciones en el tamaño del núcleo de los hepatocitos se evidencia a las exposiciones subletales de metales, también ha cambios drásticos de temperatura y en este caso a las HAP's, estas alteraciones se pueden tomar como inicios de patologías en el órgano (Figueiredo-Fernandes et al., 2007).

Sabemos que unas de las funciones del hígado es el metabolismo y excreción de sustancias tóxicas, por lo cual la exposición de altas concentraciones de BaP generó un cambio morfológico hepático que no permite que se desarrolle estos procesos, por lo cual el DTC muestra que hubo un daño moderado en el tejido (Abalaka, 2015), ya que el índice DTC (grado de cambio de los tejidos) mostró un resultado de daño moderado en el tejido hepático se esperaría que histopatológicamente se observara lesiones como cambios degenerativos, vacuolizaciones, cambios en los sinusoides

y otros tipos de lesiones que confirme este resultado. La disminución en el diámetro de los núcleos puede ser un indicativo de degeneración celular empezando por la condensación y reducción del diámetro de los núcleos que sería como una apoptosis precoz, esto por exposiciones a toxinas como tributilestaño y en este caso a una exposición de 10ug/g de BaP después de 10 días (tabla 2) (Marcon et al., 2015).

Tabla 2. Área, diámetro, número de hepatocitos y grado de cambios en los tejidos (GTC) en luminosa *Aequidens metae* expuestos vía intraperitoneal a tres concentraciones de BaP (n=6), con muestreos a las 72 horas y 10 días.

Tratamiento	Área (µm ²)		Diámetro (µm)		Número de núcleos		GTC	
	72 h	10 días	72 h	10 días	72 h	10 días	72 h	10 días
Control negativo	17,07±0,16 ^{abc}	17,01±0,11 ^a	4,49±0,02 ^a	4,91±0,02 ^{abc}	25,45±0,43 ^{abode}	25,06±0,51 ^{abcd}	8,73±0,72 ^{abcd}	8,43±0,27 ^{ab}
Control solvente	17,51±0,18 ^{abcd}	17,17±0,18 ^{abcd}	4,61±0,02 ^a	4,65±0,02 ^a	25,44±0,79 ^{abodef}	25,62±1,34 ^{abc}	8,91±0,21 ^{abc}	8,79±0,45 ^a
β naftoflavona	19,52±0,14 ⁱ	18,11±0,20 ^{def}	5,17±0,02 ^{de}	5,14±0,03 ^d	28,75±0,62 ^{efghi}	25,13±0,60 ^{abc}	14,97±0,47 ^{efg}	12,86±0,67 ^{de}
BaP 0,1 µg/g	18,40±0,15 ^{efg}	17,11±0,13 ^{ab}	5,32±0,02 ^f	4,87±0,02 ^{bc}	25,95±0,75 ^{abodefg}	24,33±1,06 ^{ab}	21,62±1,11 ^{ghij}	16,27±0,84 ^{efgh}
BaP 1,0 µg/g	18,35±0,13 ^{efgh}	18,01±0,17 ^{de}	5,17±0,02 ^{de}	4,84±0,02 ^b	26,30±0,49 ^{abodefgh}	23,95±0,64 ^a	25,28±1,72 ^{klmn}	19,27±1,14 ^{fghi}
BaP 10 µg/g	20,04±0,16 ⁱ	18,53±0,16 ^{efgh}	5,73±0,02 ^f	5,32±0,02 ^g	30,50±0,63 ⁱ	28,39±1,05 ^{defghi}	36,94±2,05 ^o	28,74±1,23 ^{no}

^{a-i} Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$), entre tratamientos para la misma variable respuesta.

La disminución en el tamaño de los núcleos como se refleja en este estudio después de 10 días de exposición a BaP puede estar relacionado a una multiplicación de hepatocitos durante el proceso de reemplazo de células dañadas (Sula & Aliko, 2017), esto puede ser indicativo de degeneración celular.

Todas estas alteraciones histopatológicas del hígado a nivel morfométrico son un buen biomarcador para evaluación de exposiciones a contaminantes como los HAP's ya que sus resultados son significativos y pueden evaluar los primeros efectos y respuestas agudas a estos contaminantes (Camargo & Martinez, 2007).

En cuanto al objetivo 3, participé y colaboré activamente en diferentes procesos investigativos realizados por el Grupo de Investigación en Biotecnología y Toxicología Acuática y Ambiental (BioTox), adscrito a la Facultad de Ciencias Agropecuarias

y Recursos Naturales de la Universidad de los Llanos, lo cual contribuyo a mis capacidades de redacción de textos en base al análisis de las lecturas de artículos científicos, la manera de buscar información asertiva y autentica, el manejo de las muestras para procesar en laboratorio, como el método de fijación de las muestras de hígado para histología, la medición y análisis de los datos microscópicos de los tejidos muestreados, manejar programas como Mendeley para la citaciones de bibliografía y Image J para la medición de las células de los órganos en este caso el diámetro y área de los núcleos, que complementa mis conocimientos y habilidades como profesional.

8. CONCLUSIONES

El pez cíclido luminosa *Aequidens metae* es un adecuado bioindicador de exposición para determinar efectos del hidrocarburo aromático policíclico BaP.

La exposición a BaP no indujo cambios sobre los parámetros de calidad de agua monitoreados.

Se comprobó el uso de la histopatología como biomarcador de exposición a la exposición a BaP en *Aequidens metae*.

El uso de la inyección intraperitoneal es una vía de administración adecuada de xenobioticos puesto que no indujo alteraciones morfológicas en el hígado de *Aequidens metae*.

BaP indujo alteraciones en el tejido hepático a las diferentes concentraciones... en *Aequidens metae*.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar la necropsia en el menor tiempo posible después de efectuada la necropsia para evitar la presencia de alteraciones post mortem en los tejidos.

Con el fin de garantizar la preservación de los tejidos después de ubicarlos en el fijador se recomienda almacenarlos a temperatura inferior a 10 °C.

Teniendo en cuenta que el reactivo empleado (BaP) es tóxico, debe realizarse la disposición adecuada de sus residuos, para evitar la contaminación de las fuentes de agua.

Hacer un análisis histopatológico de mayor resolución para la observación de más lesiones y poder correlacionar los datos del índice DTC.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalaka, S. E. (2015). Heavy metals bioaccumulation and histopathological changes in *Auchenoglanis occidentalis* fish from Tiga dam, Nigeria. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40201-015-0222-y>
- Avellaneda Cusara, A. (2013). Petróleo, seguridad ambiental y exploración petrolera marina en Colombia. *Íconos - Revista de Ciencias Sociales*, 0(21), 11. <https://doi.org/10.17141/iconos.21.2005.81>
- Benavides López De Mesa Msc, J., Quintero Msc, G., Guevara Vizcaíno, A. L., Carolina, D., Cáceres, J., Milena Gutiérrez Riaño, S., & García, J. M. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. In *hemeroteca.unad.edu.co*. www.unicolmayor.edu.co
- Camargo, M. M. P., & Martinez, C. B. R. (2007). Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5(3), 327–336. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252007000300013>
- Corredor-Santamara, W., Serrano Gómez, M., & Velasco-Santamara, Y. M. (2016). Using genotoxic and haematological biomarkers as an evidence of environmental contamination in the Ocoa River native fish, Villavicencio—Meta, Colombia. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1753-0>
- Costa, P. M., Chicano-Galvez, E., López Barea, J., Delvalls, T. A., & Costa, M. H. (2010). Alterations to proteome and tissue recovery responses in fish liver caused by a short-term combination treatment with cadmium and benzo[a]pyrene. *Environmental Pollution*, 158(10), 3338–3346. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.07.030>
- Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J. V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S. M., Carrola, J., Matos, P., & Fontainhas-Fernandes, A. (2007). Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 27(3), 103–109. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2007000300004>
- Hernández-acevedo, J. H., Machado-allison, A., & Lasso, C. A. (2015). *Aequidens superomaculatum* (Teleostei: Cichlidae) una nueva especie del alto Orinoco y Río Negro, Venezuela. *Biota Colombiana*, 16(2), 96–106.
- Lemaire-Gony, S., & Lemaire, P. (1992). Interactive effects of cadmium and benzo(a)pyrene on cellular structure and biotransformation enzymes of the liver of the European eel *Anguilla anguilla*. *Aquatic Toxicology*, 22(2), 145–159. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(92\)90029-M](https://doi.org/10.1016/0166-445X(92)90029-M)
- Marcon, L., Bazzoli, N., Honor Munteer, A., & Anjos Benjamin, L. Dos. (2015). Histological and Histometric Evaluation of the Liver in *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae), Exposed to Different Concentrations of an Organochlorine Insecticide. *Anatomical Record*, 298(10), 1754–1764.

<https://doi.org/10.1002/ar.23196>

- Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez, H., Álvarez, H., & Gutiérrez, A. (2005). Acta bioquímica clínica latinoamericana Hidrocarburos aromáticos policíclicos . Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39(1), 27–36.
- Miller, K. P., & Ramos, K. S. (2001). Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metabolism Reviews*, 33(1), 1–35. <https://doi.org/10.1081/DMR-100000138>
- Monteiro, P. R. R., Reis-Henriques, M. A., & Coimbra, J. (2000). Plasma steroid levels in female flounder (*Platichthys flesus*) after chronic dietary exposure to single polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, 49(5), 453–467. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(99\)00085-9](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(99)00085-9)
- Patrocinante, P., Kausel, D. G., & Henriquez Sánchez, N. I. (2015). EFECTO DE BENZO (A) PIRENO SOBRE LA EXPRESIÓN DE CITOCROMO P450 (CYP1A) Y OTROS FACTORES EN HÍGADO Y PITUITARIA DE *Cyprinus carpio*.
- Pérez-Morales López, G., Morales Gómez, P., & Haza Duaso, A. I. (2016). Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (I): Toxicidad, exposición de la población y alimentos implicados. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 10(1), 1–15. https://doi.org/10.5209/rev_rccv.2016.v10.n1.51869
- Poleksić, V., & Mitrović-Tutundžić, V. (1994). Las branquias de los peces como monitor de los efectos subletales y crónicos de la contaminación. *Efectos Subletales y Crónicos De*. https://www.researchgate.net/profile/Vesna_Poleksic/publication/303517059_Fish_gills_as_a_monitor_of_sublethal_and_chronic_effects_of_pollution/links/5984c23eaca27266ad9a268e/Fish-gills-as-a-monitor-of-sublethal-and-chronic-effects-of-pollution.pdf
- Rondón Barragán, I., Ramírez Duarte, W., & Eslava Mocha, P. (2007). Evaluación de los efectos tóxicos y concentración letal 50 del surfactante Cosmoflux® 411F sobre juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Rev. Colomb. Cienc. Pecu*, 431–446.
- Salazar, C. (2008). *Instituto Politecnico Nacional Escuela Nacional De Ciencias Biologicas S E N T a: Lucia Salazar Coria*.
- Sula, E., & Aliko, V. (2017). Pathological changes in liver morphology of Crucian carp (*Carassius carassius*) from Seferani Lake in Dumrea region. In *Albanian j. agric. sci*.
- Torres R., G. A., González P., S., & Peña S., E. (2010). Descripción anatómica, histológica y ultraestructural de la branquia e hígado de tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Morphology*, 28(3), 703–712. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022010000300008>

Vives, Í., Grimalt, J. O., & Guitart, R. (2001). *Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana*. 45–51.

Vogelbein, W. K., & Unger, M. A. (2006). Liver carcinogenesis in a non-migratory fish: The association with polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 26(1), 11–20.