



pp. 52 – 78

Evaluación de la genotoxicidad del agua del río Siete en juveniles de tilapia *Oreochromis Niloticus* mediante la prueba de micronúcleos y ensayo cometa

Evaluation of the genotoxicity of Siete river water on juvenile tilapia *Oreochromis Niloticus* using the micronucleus test and comet assay

Juan Antonio Gómez H.
Universidad de Panamá, Panamá
juanay05@hotmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-8548-3018>

Brython Josue Jaramillo Herrera
Universidad Técnica de Machala, Ecuador
bjaramill6@utmachala.edu.ec
<https://orcid.org/0009-0003-5484-6087>

Roberto Eduardo Román Mora
Universidad Técnica de Machala, Ecuador.
rroman3@utmachala.edu.ec
<https://orcid.org/0009-0002-3732-5987>

Janzel Villalaz
Universidad de Panamá, Panamá
janzel.villalaz@yahoo.com
<https://orcid.org/0000-0001-8914-3216>

Italo Goti
Universidad de Panamá, Panamá
italo.goti@up.ac.pa
<https://orcid.org/0000-0001-5702-5389>

Víctor Hugo González
Universidad Técnica de Machala, Ecuador
vgonzalez@utmachala.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-9127-0342>



Sergio Valverde Durán
Universidad Técnica de Machala, Ecuador
svalverde@utmachala.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0003-0423-3883>

Mauro Nirchio
Universidad Técnica de Machala, Ecuador
mauro.nirchio@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-7171-2433>

Recepción: 21/03/2025

Aceptado: 16/06/2025

DOI <https://doi.org/10.48204/j.scientia.v35n2.a7700>

Resumen

La contaminación por metales pesados es una de las principales amenazas para los ecosistemas acuáticos que genera efectos adversos sobre la biota. En este estudio, se evaluó la genotoxicidad del agua del río Siete en juveniles de *Oreochromis niloticus* mediante el ensayo de micronúcleos y el ensayo Cometa. Se establecieron cinco tratamientos con diferentes concentraciones de agua contaminada (0 %, 10 %, 25 %, 50 % y 100 %), para la evaluación de la supervivencia y los efectos genotóxicos en eritrocitos tras 19 días de exposición. El análisis del agua y sedimentos reveló que las concentraciones de arsénico en el agua y el plomo en los sedimentos superan los límites normativos, lo que podría representar un riesgo ambiental para la biota acuática. Los biomarcadores genotóxicos mostraron una relación dosis-dependiente con la contaminación, evidencia por un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos y en la fragmentación del ADN en los tratamientos con mayores concentraciones de agua contaminada ($p < 0,05$). El ensayo Cometa reflejó niveles progresivos de daño en el ADN, se observó una disminución en la actividad locomotora en los peces expuestos a metales pesados, mientras que en el grupo control se registró un aumento en la agresión intraespecífica y el canibalismo. Estos resultados subrayan la importancia del monitoreo ambiental continuo y el uso de *O. niloticus* como bioindicador de contaminación por metales pesados en ecosistemas acuáticos.

Palabras clave: Genotoxicidad, *Oreochromis niloticus*, micronúcleos, metales pesados, río Siete, contaminación ambiental, supervivencia.

Abstract

Heavy metal contamination is one of the primary threats to aquatic ecosystems, resulting in adverse effects on marine life. In this study, the genotoxicity of Siete River water on juvenile *Oreochromis niloticus* was evaluated using the micronucleus assay and the Comet assay. Five treatments with different concentrations of contaminated water (0%, 10%, 25%, 50%, and 100%) were established to evaluate survival and genotoxic effects on erythrocytes after 19 days of exposure. Analysis of water and sediments revealed that arsenic concentrations in the water and lead concentrations in the sediment exceeded regulatory limits, which could represent an environmental risk to aquatic life.



Genotoxic biomarkers showed a dose-dependent relationship with contamination, as evidenced by a significant increase in micronucleus frequencies and DNA fragmentation in treatments with higher concentrations of contaminated water ($p < 0.05$). The Comet assay showed progressive levels of DNA damage, with a decrease in locomotor activity observed in fish exposed to heavy metals, while an increase in intraspecific aggression and cannibalism was recorded in the control group. These results underscore the importance of continuous environmental monitoring and the use of *O. niloticus* as a bioindicator of heavy metal contamination in aquatic ecosystems.

Key words: Genotoxicity, *Oreochromis niloticus*, micronuclei, heavy metals, Rio Siete, environmental pollution, survival.

Introducción

La contaminación por metales pesados representa una de las principales amenazas para los ecosistemas acuáticos a nivel global debido a su persistencia, toxicidad y capacidad de bioacumulación en los organismos expuestos (Briffa et al., 2020; Rama Jyothi, 2021). Estos elementos, derivados principalmente de actividades antropogénicas como la industrialización, la minería y el uso excesivo de agroquímicos, se dispersan en el ambiente y se acumulan en suelos y sedimentos, lo que afecta la calidad del agua en ríos y pozos ubicados en zonas mineras (Sun et al., 2025). Su naturaleza no biodegradable favorece su acumulación a largo plazo en los ecosistemas, que aumenta los riesgos tanto para la biodiversidad acuática como para la salud humana (Ogola et al., 2025; Riani et al., 2025; Shetty et al., 2025).

En los organismos expuestos, los metales pesados pueden provocar diversos efectos tóxicos, incluyendo alteraciones neurológicas, disfunciones hepáticas y renales e incluso enfermedades crónicas como el cáncer (Alsherif et al., 2022; Arce Uribe & Olivares-Rubio, 2022; Gallo et al., 2025). En los ecosistemas acuáticos, estos contaminantes ingresan a los organismos por diferentes vías, como la absorción branquial y cutánea o la ingesta de presas contaminadas, lo que potencia los procesos de bioacumulación y biomagnificación en la cadena trófica (Kumar et al., 2024; Saidon et al., 2024).

Uno de los principales focos de contaminación por metales pesados es la minería, una actividad que, además de ser una de las principales fuentes de estos



elementos en los ecosistemas acuáticos, tiene una gran relevancia económica en Ecuador. En 2015, las exportaciones de oro alcanzaron los 681 millones de dólares, consolidándolo como el cuarto producto de exportación después del banano, camarón y cacao (Matute Sánchez & Medina Peña, 2025). Asimismo, se estima que las reservas mineras confirmadas en el 10 % del territorio explorado del país representan aproximadamente el 114 % del PIB de 2015 (Herdoíza et al., 2017). No obstante, la minería conlleva impactos ambientales severos, especialmente cuando la extracción de minerales se realiza sin una adecuada gestión de residuos.

Un caso emblemático de esta problemática es el cantón Camilo Ponce Enríquez, en la provincia de El Oro, donde la minería aurífera ha generado un impacto ambiental significativo. La descarga de aguas residuales con altos niveles de metales pesados ha contaminado gravemente el río Siete, receptor de los relaves y lixiviados de las plantas de procesamiento de oro. Estudios previos han reportado concentraciones elevadas de arsénico (As), cobre (Cu) y zinc (Zn) en el agua y sedimentos del río, con niveles que superan en órdenes de magnitud de 10 a > 1000 los umbrales de toxicidad para la vida acuática (Appleton et al., 2001). Sin embargo, la ausencia de estudios científicos que evalúen directamente el efecto de esta contaminación en organismos acuáticos específicos que limita la implementación de estrategias de mitigación.

Los metales pesados pueden inducir daño genético en los organismos acuáticos, que compromete la estabilidad genómica y afecta la viabilidad de las poblaciones. Para evaluar estos efectos, el uso de organismos centinela se ha consolidado como una estrategia clave en ecotoxicología (Rubio-Vargas et al., 2024). En este contexto, los peces han sido ampliamente utilizados como modelos experimentales debido a su sensibilidad a los contaminantes y su capacidad para reflejar riesgos ambientales y sanitarios (Bancel et al., 2024).

Entre los biomarcadores más empleados para evaluar el daño genético en peces destaca el ensayo de micronúcleos, que permite detectar aberraciones cromosómicas y fragmentos de ADN no incorporados al núcleo principal y



proporciona una medida del efecto mutagénico de los metales pesados (Faita et al., 2013; Nirchio et al., 2019; Rubio-Vargas et al., 2024). Sin embargo, este ensayo no permite cuantificar con precisión la magnitud del daño en el ADN a nivel molecular, por lo que es necesario complementarlo con pruebas que evalúen la fragmentación del material genético en células individuales.

El ensayo Cometa, también conocido como electroforesis en gel de células individuales, ha sido ampliamente utilizado como biomarcador de genotoxicidad en peces expuestos a agentes ambientales nocivos (Chatha et al., 2023; Simoniello et al., 2009; Tasneem & Yasmeen, 2018). Este ensayo permite detectar rupturas de ADN de cadena simple y doble, que proporciona información detallada sobre la extensión y gravedad del daño en la estructura del material genético (Langie et al., 2015; McKelvey-Martin et al., 1993; Nandhakumar et al., 2011). Su alta sensibilidad y capacidad para evaluar respuestas dosis-dependientes lo convierten en una herramienta fundamental para el monitoreo de contaminantes genotóxicos en ambientes acuáticos (Ali et al., 2009; Jiang et al., 2023). Por lo tanto, la combinación de estos métodos proporciona una evaluación integral del daño genético, permitiendo identificar tanto efecto clastogénico, como alteraciones en la integridad del ADN.

Entre los peces utilizados en evaluaciones ecotoxicológicas, diversas especies de tilapia han sido empleadas como bioindicadores debido a su sensibilidad a la contaminación, su amplia distribución en ecosistemas acuáticos y su capacidad para acumular metales pesados en sus tejidos (Abass, 2024; Chinedu et al., 2024; Lemos et al., 2005). Estas características las convierten en organismos ideales para el monitoreo ambiental, ya que permiten evaluar la presencia y los efectos de contaminantes en cuerpos de agua afectados por actividades humanas, como la minería (Silva et al., 2024; Zannat et al., 2024).

Con el objetivo de evaluar el daño genotóxico potencial del agua del río Siete se aplicó los ensayos de micronúcleos y Cometa como herramientas para detectar alteraciones en el ADN inducidas por la exposición a contaminantes.



Materiales y Métodos

Análisis y características del agua y sedimentos del río Siete.

El agua utilizada en el experimento fue recolectada del río Siete, ubicado en el cantón Camilo Ponce Enríquez, provincia de Azuay, Ecuador. La recolección se llevó a cabo mediante baldes de 20 litros hasta completar un tanque de una tonelada. Se observó un aspecto turbio y una aparente ausencia de organismos vivos, lo que sugiere afectación ambiental.

Se analizaron muestras de agua y sedimentos para determinar la presencia de arsénico, cadmio, plomo, mercurio cianuros, mediante técnicas certificadas. Los análisis fueron realizados por ANAVANLAB CIA. LTDA., laboratorio acreditado bajo SAE LEN 13-006 y conforme a la norma internacional NTE INEN ISO/IEC 17025:2018, garantizando la confiabilidad de los resultados.

Los metales en agua fueron determinados mediante los métodos SM 3114 C, SM 3111 B y EPA 3015, mientras que en sedimentos se emplearon EPA 7061 A, EPA 7471 B y EPA 3051. La cuantificación de cianuros se realizó con el método SM 4500-CN E. Los resultados fueron comparados con los límites establecidos en la norma NTE INEN 1108:2020 para agua de consumo humano y en los criterios de calidad AM097A, Anexo 1 y Anexo 2, que regulan la calidad de fuentes de agua y suelos.

Aclimatación de los organismos

Se seleccionaron 90 juveniles de *Oreochromis niloticus*, provenientes de una granja acuícola en Posorja, Ecuador, con un peso promedio de 11 g. Los peces fueron transportados en bolsas plásticas con oxígeno y aclimatados en un tanque de 1 tonelada.



Diseño experimental

Se empleó un diseño completamente al azar, con cinco tratamientos y tres repeticiones por tratamiento. Los tratamientos consistieron en T0 (control) con 0 % de agua contaminada, T1 con 100 %, T2 con 50 %, T3 con 25 % y T4 con 10 %. Cada unidad experimental estuvo conformada por un recipiente de plástico de 72,8 litros, en el que se alojaron seis peces por tanque. Para garantizar una oxigenación óptima, se implementó un sistema de aireación continua mediante mangueras conectas a piedras difusoras.

Extracción de sangre y preparación de extendidos sanguíneos.

Se extrajeron muestras de sangre de dos individuos por unidad experimental, minimizando el estrés mediante anestesia con benzocaína (Schroeder, 2021). La recolección se realizó por punción en la vena caudal con jeringas de 1 ml heparinizadas y agujas de ½ pulgada.

Las muestras se extendieron sobre portaobjetos limpios y se dejaron secar al aire. Posteriormente, se fijaron con metanol absoluto durante cinco minutos y se tiñeron con Giemsa al 10 % por 15 minutos. Para la tinción, se utilizó un buffer fosfato de pH 6,88. Luego del enjuague con agua destilada y secado en posición vertical, los extendidos fueron protegidos con barniz transparente y cubreobjetos, almacenándose en un organizador para su análisis microscópico.

Análisis microscópico y recuento de células con micronúcleos

Las muestras fueron analizadas mediante microscopía de campo claro mediante un fotomicroscopio Olympus CX31 equipado con un objetivo de inmersión de 100x y un aumento total de 1000x. Para cada portaobjetos, se capturaron entre 15 y 25 imágenes seleccionadas aleatoriamente, dependiendo de la densidad de eritrocitos observada, con el fin de registrar un mínimo de 2 000 células por individuo.

Las imágenes obtenidas fueron organizadas en carpetas clasificadas por tratamiento y repetición y siguió un sistema de etiquetado estructurado para



garantiar la trazabilidad de la información. El conteo de eritrocitos y micronúcleos se realizó sobre las imágenes digitales mediante la herramienta de conteo del “software” Adobe Photoshop, evaluadas por un único observador. Las frecuencias de células micronucleadas se expresaron por cada 2 000 células contadas.

Ensayo Cometa:

El ensayo Cometa se realizó siguiendo el protocolo estándar (Lu et al., 2017; Singh et al., 1988). Se utilizaron muestras de sangre diluida (1:10 en buffer fosfato salino), mezcladas con agarosa de bajo punto de fusión de 37 °C y depositadas sobre portaobjetos recubiertos con agarosa normal. Tras la solidificación se llevó a cabo la lisis celular y la electroforesis en condiciones alcalinas. Luego, los portaobjetos fueron neutralizados con tampón Tris 0.4 (pH7,5), fijados en metanos absoluto y teñidos con DAPI para su análisis en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX53, equipado con una cámara digital y el “software” CellSnes Dimension. Se analizaron al menos 50 cometas por individuo.

Para cuantificar el daño genético, se evaluaron la longitud de la cola (“Tail Length”), el porcentaje de ADN en la cola (“TailDNApercent”) y el “Extent Tail Moment” (ETM), según Kumaravel et al. (2009). El análisis de imágenes se realizó con ImageJ y el complemento OpenComet (Gyori et al., 2014), proporcionado mediciones precisas para la evaluación del daño en el ADN. “TailDNApercent” se utilizó como parámetro clave debido a su robustez y baja variabilidad en la estimación del daño genético.

Análisis estadístico

Para evaluar la homogeneidad y normalidad de los datos, se aplicaron las pruebas de Levene y Kolmogorov-Smirnov, respectivamente. Una vez verificados estos supuestos, se realizó un ANOVA inicial para determinar si era posible combinar las repeticiones dentro de cada tratamiento, lo que permitió aumentar la potencia estadística y mejorar la precisión en la detección de diferencias entre



grupos, minimizando sesgos por variaciones aleatorias. Posteriormente, se llevó a cabo un AONOVA de una vía para evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de agua contaminada sobre la frecuencia de micronúcleos y los parámetros del ensayo Cometa. Para el análisis *post hoc*, se empleó el test de Fisher LSD (“Least Significant Difference”) en la comparación de la frecuencia de micronúcleos ($p < 0,05$), ya que este método es más sensible en estudios con un número reducido de grupos y cuando existen hipótesis a priori sobre la existencia de diferencias significativas. (Asheskin, 2007; Sokal & Rohlf, 2011).

Por otro lado, para los parámetros del ensayo Cometa, como el “TailDNApercent” y el “Extent Tail Moment” (ETM), se utilizó la prueba de Tukey, más conservadora y adecuada para comparaciones múltiples sin hipótesis previas, que reduce la probabilidad de error tipo I. La mayor variabilidad observada en estos parámetros justificó el uso de esta prueba, ya que permite un control más efectivo de la tasa de error en el análisis de comparaciones múltiples (Sheskin, 2007).

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete Statgraphics Centurion, lo que permitió identificar diferencias significativas entre tratamientos y evaluar el impacto diferencial de la contaminación en los biomarcadores de genotoxicidad.

Resultados:

El análisis de la calidad del agua y sedimentos del río Siete permitió cuantificar la presencia de metales pesados con potencial impacto en el ecosistema (Tabla 1). Los resultados revelaron que la concentración de arsénico en el agua (0,038 mg/L) supera el límite permitido de 0,01 mg/l, mientras que otros elementos, como cianuros, cadmio, mercurio y plomo, se encuentran dentro de los valores normativo establecidos.

En sedimentos, las concentraciones de cadmio (2,1 mg/kg) y plomo (24,8 mg/kg) excedieron los límites permitidos de 0,5 mg/(kg) 6 19 mg/kg, respectivamente, lo que evidencia una acumulación significativa de estos metales



en el lecho del río. En contraste, los valores de arsénico, cianuro libre y mercurio en los sedimentos cumplen con la normativa vigente, lo que sugiere que, por el momento, su presencia no representa una amenaza inmediata.

Supervivencia:

Los datos mostraron una disminución progresiva de la supervivencia de los peces con el aumento de la contaminación (Figura 1). En el grupo control (T0), la supervivencia se mantuvo cercana al 100 % durante las dos primeras semanas, reduciéndose al 23 % en la tercera. En el tratamiento con agua 100 % contaminada (T1), la supervivencia descendió del 90 % en la primera semana a menos del 60 % en la segunda y alcanzó, aproximadamente un 30 % en la tercera.

En el tratamiento con 50 % de agua contaminada (T2), la supervivencia asó del 95 %, en la primera semana al 70 % en la segunda y al 40 % en la tercera. De manera similar, en T3 (25 %), los valores iniciales fueron del 95 % y disminuyó a menos del 80 % en la segunda semana, hasta el 60 % en la tercera. En el tratamiento con la menor concentración de agua contaminada (T4, 10 %), la supervivencia fue comparable al grupo control durante la primera semana (~ 100 %), luego descendió a más del 80 % en la segunda, hasta 70 % en la tercera. Estos resultados evidencian un efecto dosis-dependiente de la contaminación sobre la mortalidad de los organismos expuestos.

Tabla 1.

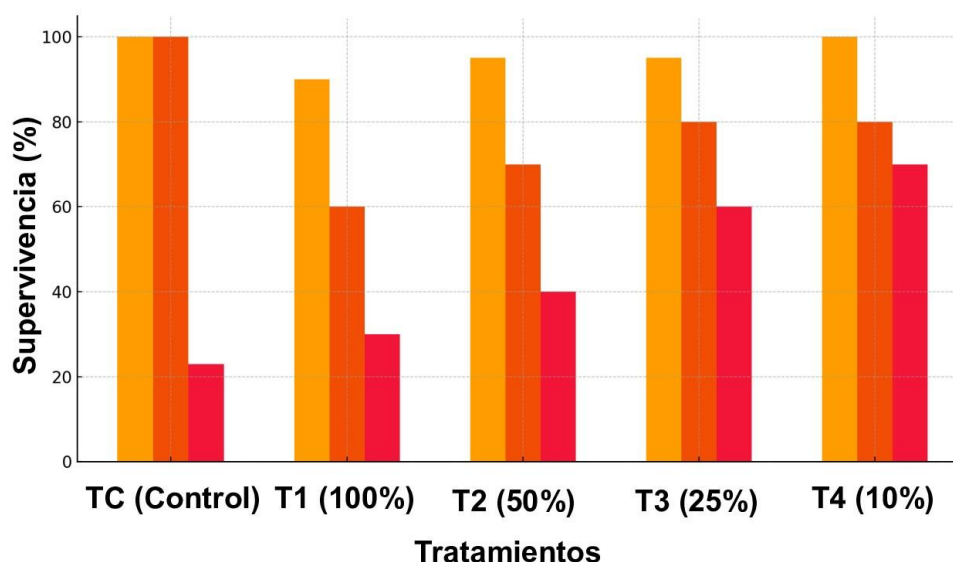
Concentraciones de metales pesados y cianuros en muestras de agua y sedimentos del río Siete en comparación con los límites normativos.

Tipo de Muestra	Parámetro	Método Analítico	Unidad	Resultado	Valor	
					Norma	Cumplimiento
Agua	Arsénico	SM 3114 C, EPA 3015	mg/L	0.038	0.01	No Cumple
Agua	Cianuros	SM 4500 – CN E	mg/L	< 0.010	0.1	Cumple
Agua	Cadmio	SM 3111 B, EPA 3015	mg/L	< 0.001	0.003	Cumple
Agua	Mercurio	SM 3114 C, EPA 3015	mg/L	< 0.0010	0.006	Cumple
Agua	Plomo	SM 3111 B, EPA 3015	mg/L	< 0.001	0.01	Cumple
Sedimentos	Arsénico	EPA 7061 A, 3051	mg/kg	0.1	12	Cumple
Sedimentos	Cianuro Libre	SM 4500-CN E	mg/kg	< 0.1	0.9	Cumple
Sedimentos	Cadmio	EPA 3051, 7061 A	mg/kg	2.1	0.5	No Cumple
Sedimentos	Mercurio	EPA 7061 A, 3051	mg/kg	< 0.1	0.1	Cumple
Sedimentos	Plomo	EPA 3051, 7061 A	mg/kg	24.8	19	No Cumple

Un aspecto importante que destacar observado en este estudio es la mayor actividad y la incidencia de canibalismo en el grupo control, en contraste con los peces expuestos a agua contaminada en los que se observó un comportamiento letárgico.

Figura 1

Índice de supervivencia de los organismos expuestos a diferentes concentraciones de agua contaminada del río Siete durante tres semanas



Nota: Los tratamientos incluyen un control (Tc) y cuatro concentraciones de agua contaminada: T1 (100%), T2 (50%), T3 (25%) y T4 (10%). La supervivencia se expresa en porcentaje y se presenta para cada semana de evaluación. Las barras en amarillo representan la Semana 1, en naranja la Semana 2, y en rojo la Semana 3.

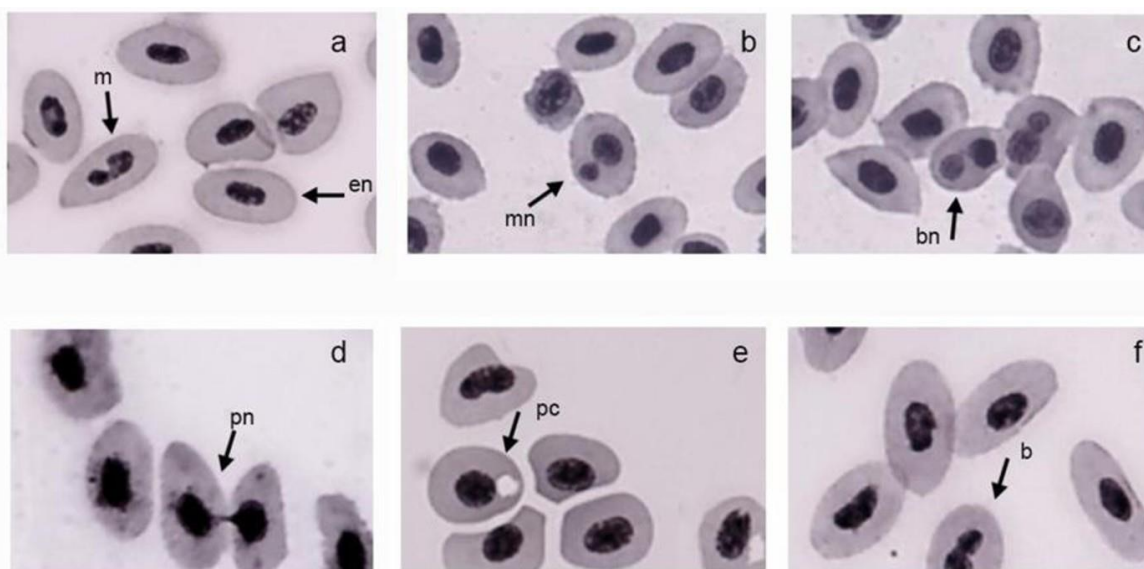
La Figura 2 presenta las anomalías nucleares detectadas en eritrocitos de *Oreochromis niloticus*, identificadas mediante tinción y análisis microscópico. Entre las alteraciones observadas se encuentran muescas (m), micronúcleos (mn), binucleación (bn), puentes nucleoplásmicos (pn), pérdida de citoplasma (pc) y buds (b).

El análisis de la frecuencia de micronúcleos evidenció un patrón dependiente de la concentración de agua contaminada (ver análisis estadístico). Si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con 10 %, 25% y 50 % respecto al grupo control; la exposición al 100 % de agua del río

Siete generó un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de *O. niloticus*.

Figura 2

Anomalías nucleares observadas en eritrocitos de Oreochromis niloticus expuestos a agua contaminada del río Siete.



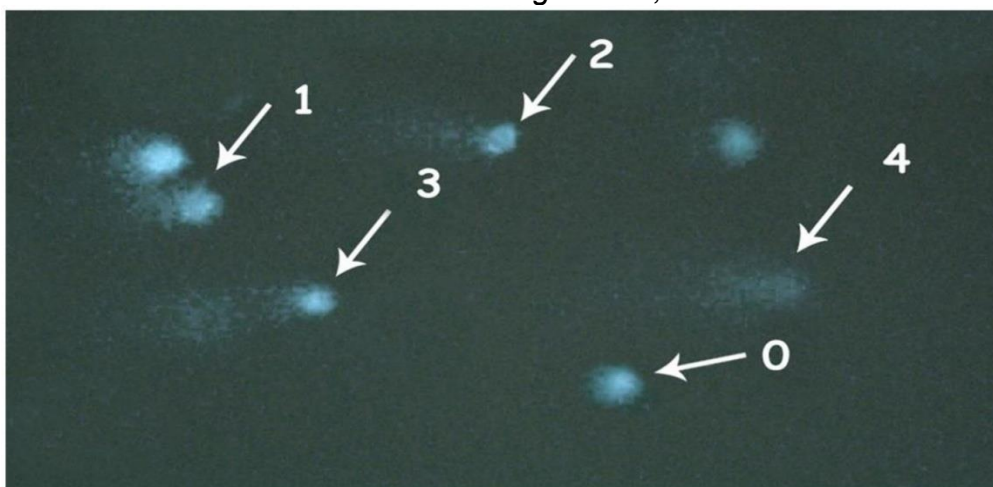
Nota: Las flechas señalan diferentes tipos de alteraciones celulares: (m) muesca, fragmentación o anomalía estructural del núcleo; (mn) micronúcleos, estructuras nucleares independientes cercanas al núcleo principal; (bn) binucleación, presencia de dos núcleos en un mismo eritrocito; (pn) puentes nucleoplásmicos, conexiones entre núcleos o fragmentos nucleares; (pc) pérdida de citoplasma, reducción del volumen citoplasmático; y (b) buds, protrusiones o extensiones nucleares.

El ensayo Cometa evidenció distintos niveles de daño en el ADN, reflejados en la variabilidad de la longitud e intensidad de las "colas de cometa" observadas en las células evaluadas. Se identificaron eritrocitos con cinco niveles de daño genético, clasificados del 0 al 4, según la extensión de la fragmentación del ADMN. En el nivel 0, las células mostraron ADN intacto sin signos de fragmentación y mantuvo una estructura compacta y uniforme. El nivel 1 presentó daño leve, caracterizado por una cola corta con baja cantidad de fragmentos migrados. En el nivel 2, el daño fue moderado, con una cola visible y mayor cantidad de ADN

fragmentado. El nivel 3 reflejó daño severo, con una cola extensa y difusa con una cantidad considerable de fragmentos de ADN. Finalmente, el nivel 4 representó el daño más severo, con una cola prominente y altamente extendida, que indicó una fragmentación significativa del ADN (Figura 3).

Figura 3

Imagen de microscopía de fluorescencia, donde se identificaron eritrocitos con cinco niveles distintos de daño genético, clasificados del 0 al 4.



Se observó diferencias significativas en el porcentaje de ADN en la cola del cometa (Tabla 2). La prueba *post hoc* de Tukey identificó diferencias significativas entre las concentraciones de manera consistente para todas las variables. Por ejemplo, el porcentaje de ADN en la cola ("Tail DNA percent") fue significativamente mayor en las concentraciones más altas (50 % y 100 %) en comparación con el control (0 %), lo que reflejó un incremento evidente del daño genotóxico.

Tabla 1

Resultados del ANOVA para daños genotóxicos determinados por Ensayo Cometa

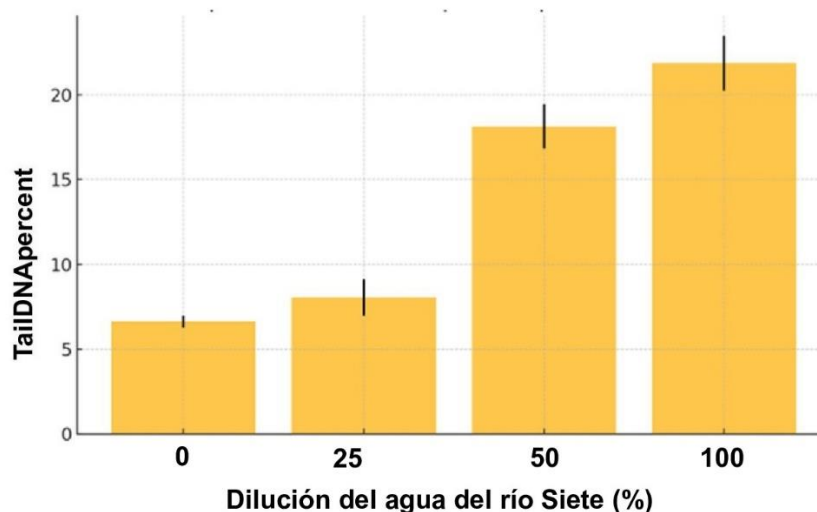
Variable	Estadístico F	p valor
Tail DNA percent	38,40	p < 0,001
ETM	24,95	p < 0,001

El análisis del ensayo cometa reveló una relación dosis-dependiente entre la concentración del agua del río Siete y el daño en el ADN, medido como “TailDNApercent” (Figura 4). A una concentración de 0 %, el “TailDNApercent” presentó valores bajos, que indica un daño mínimo en el ADN basal. Con el aumento de la concentración a 0,25 %, se observó un incremento leve en el porcentaje de ADN en la cola del cometa, lo que sugiere una ligera inducción de daño genético.

A concentraciones de 75 % y 100 %, el “TailDNApercent” mostró un aumento significativo, que evidencia una mayor fragmentación del ADN y, por lo tanto, un daño genotóxico más pronunciado. Estos resultados fueron consistentes con una tendencia dosis-dependiente, donde la mayor concentración del tratamiento se asoció con un incremento en la cantidad de ADN migrado hacia la cola del cometa. Las barras de error reflejan la variabilidad en la respuesta celular, aunque la tendencia general sugiere que el tratamiento evaluado induce daño en el ADN de manera proporcional a la dosis administrada.

Figura 4

Porcentaje de ADN en la cola del cometa en función de la concentración. Las barras de error representan la desviación estándar.

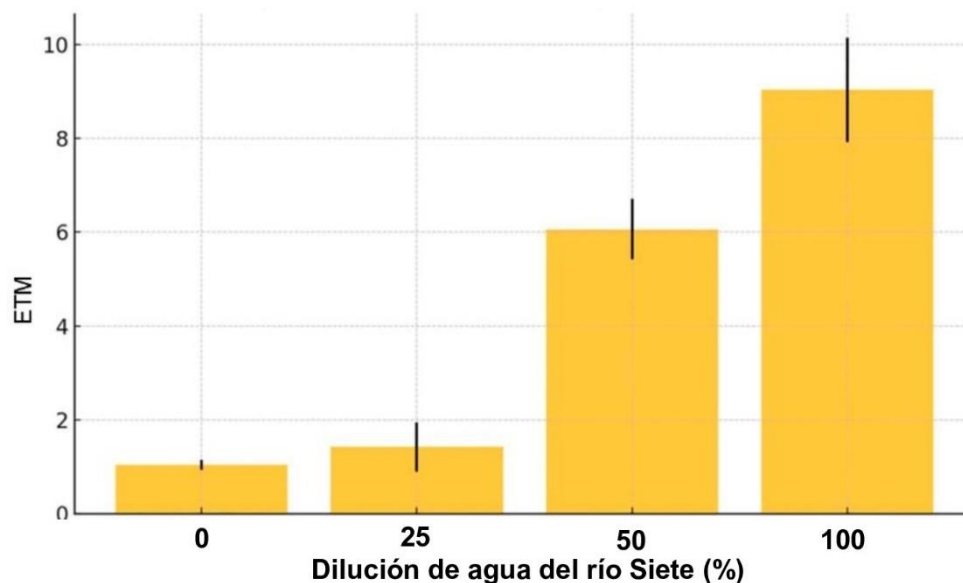


El análisis, mediante la métrica de Momento de Extensión de la Cola (ETM), evidenció una relación dosis-dependiente entre la concentración del tratamiento y la magnitud del laño en el ADN (Figura 5). A una concentración de 0 %, los valores de ETM fueron bajos, lo que indicó niveles mínimos de fragmentación del ADN. Al aumentar la concentración a 0,25 % se observó un leve incremento en el ETM, que sugiere una ligera afectación en la integridad del ADN.

A concentraciones de 50 % y 100 %, los valores de ETM se incrementaron de manera significativa, con un aumento abrupto en la migración del ADN, lo que indica una mayor extensión del daño genotóxico. Esta tendencia sugiere que el tratamiento induce a una fragmentación extensa del ADN, que facilita su migración en el ensayo cometa. Las barras de error reflejan la variabilidad en los datos, pero la tendencia.

Figura 5:

Expresión de ETM en función de la dilución del agua del río Siete. Las barras representan la desviación estándar



Análisis estadístico

La prueba de Kolmogorov-Smirnov confirmó la normalidad de los datos ($p = 0,1212$), mientras que la prueba de Levene verificó la homogeneidad de varianza ($p = 0,0617$), lo que permitió el uso de análisis paramétrico.

El ANOVA no mostró diferencias significativas entre las repeticiones dentro de cada tratamiento ($F = 0,08$; $p = 0,9273$) (Tabla 3), lo que permitió la combinación de los datos para un análisis más robusto. En contraste, el ANOVA de una vía detectó diferencias significativas entre tratamientos ($F = 2,97$; $p = 0,0289$) (Tabla 4), que indica un efecto de la exposición a distintas concentraciones de agua contaminada.

Tabla 3

Cuadro de ANOVA para Micronúcleos/2 000 eritrocitos por repetición

Fuente	SC	g.l.	CM	F	p valor
Entre acuarios	1,098	2	0,5494	0,08	0,9273
Intra acuarios	355,882	49	7,2629		
Total	356,981	51			

Tabla 4

Cuadro de ANOVA para micronúcleos/2 000 eritrocitos por dilución

Fuente	SC	g.l.	CM	F	p valor
Entre diluciones	71,9641	4	17,991	2,97	0,0289
Intra diluciones	285,017	47	6,0618		
Total	356,981	51			

Los resultados de la prueba *post hoc* de Fisher LSD (Tabla 5) indicaron que las diluciones de 0 %, 10 %, 25 % y 50 % no difieren significativamente entre sí. Sin embargo, la exposición al 100 % de agua contaminada incrementó significativa la frecuencia de micronúcleos (etiqueta B), lo que sugiere un umbral crítico de concentración que afecta la integridad genética de los eritrocitos.

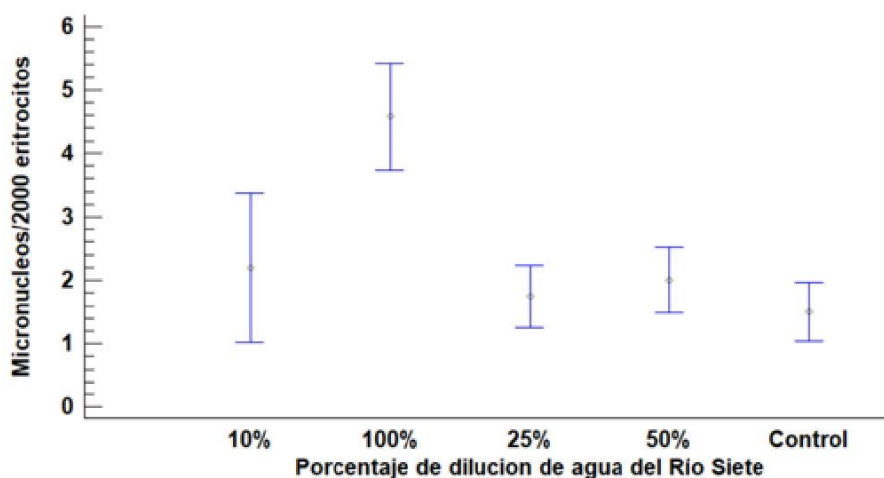
Tabla 5

Prueba post hoc de Fisher LSD para micronúcleos por tratamiento

Tratamiento	Casos	Media	Grupos homogéneos
Control	12	1,50	A
25 %	8	1,75	A
50 %	10	2,00	A
10 %	10	2,20	A
100 %	12	4,58	B

Figura 6

Promedio de micronucleos/ 2 000 eritrocitos $\pm$ desviación estándar



Discusión:

Este estudio evaluó el impacto genotóxico del agua contaminada del río Siete en juveniles de *Oreochromis niloticus*, mediante la determinación de la frecuencia de micronúcleos y el ensayo Cometa como biomarcadores de daño genético. Además, se analizaron las concentraciones de metales pesados en agua y sedimentos para correlacionarlos con los efectos biológicos en los peces expuestos. El diseño experimental contempló una exposición prolongada para estimar la concentración letal media (LC50) del agua contaminada y se evitó la alimentación de los peces durante el experimento para minimizar interferencias metabólicas en la bioacumulación de metales pesados (Rubio-Vargas et al., 2024). Sin embargo, tras 19 días, no se registró mortalidad significativa atribuida directamente a la toxicidad del agua, lo que llevó a priorizar el análisis de biomarcadores genotóxicos.

El análisis de sedimentos reveló concentraciones elevadas de arsénico y plomo, que superan los límites normativos y coinciden con estudios previos que identifican los sedimentos con reservorios de metales a largo plazo de metales pesados (Iordache et al., 2022); Yunus et al., 2020). En el agua, solo el arsénico



excedió los valores permitidos, mientras que el plomo y el mercurio se encontraron dentro de los estándares.

Los biomarcadores genotóxicos evidenciaron una relación dosis-dependiente entre la exposición a metales pesados y el daño genético en *O. niloticus*. La frecuencia de micronúcleos y el porcentaje de ADN fragmentado en el ensayo Cometa aumentaron significativamente con la concentración de agua contaminada, en concordancia con estudios previos en *O. mossmabicus*, expuestos a arsénico (Ali et al., 2009). La evaluación del ensayo Cometa reveló cinco niveles de daño en el ADN, desde células intactas (nivel 0), hasta daño severo con fragmentación extensa (nivel 4), lo que refleja alteraciones estructurales en la estabilidad genómica de los peces expuestos.

El análisis estadístico confirmó un incremento significativo en los valores de “Tail DNA percent” y “Extent Tail Moment” (ETM) en los tratamientos con concentraciones del 75 % y 100 % de agua contaminada. Este hallazgo indica una fragmentación extensa del ADN, lo que sugiere una alta vulnerabilidad genotóxica en los organismos expuestos.

El arsénico y el plomo, conocidos por inducir aberraciones cromosómicas y disfunción celular, promovieron un aumento en la frecuencia de micronúcleos y alteraciones nucleares (Faita et al., 2013; Gamica Acuña et al., 2020). Además, la exposición al arsénico en peces ha sido vinculada con efectos embriotóxicos y teratogénicos, así como anomalías estructurales en *Danio rerio* (Sánchez-Olivares et al., 2021). De manera similar, la bioacumulación de plomo afecta la estabilidad genética que altera la reproducción y viabilidad poblacional de peces en ambientes contaminados (Anetor et al., 2022).

El análisis de la frecuencia de micronúcleos reveló una tasa basal baja en el grupo control (media de 1,5 por cada 2 000 eritrocitos), lo cual es esperable debido a procesos espontáneos de daño genético que suelen ser corregidos por los mecanismos de reparación del ADN. En los tratamientos con 10 %, 25 % y 50 % de agua contaminada, las frecuencias de micronúcleos se mantuvieron dentro de un



intervalo cercano al tratamiento control y no mostraron diferencias estadísticas significativas (grupo homogéneo A). Sin embargo, en la exposición al 100 % de agua del río Siete, se evidenció un incremento notable (media de 4,58), correspondiente a un grupo distinto. Este resultado sugiere que dicha concentración supera la capacidad de respuesta celular ante el daño y genera una alteración genotóxica evidente. Este umbral crítico ha sido documentado previamente en *Danio rerio* y *Cyprinus carpio*, donde exposiciones a metales pesados también provocaron el aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos y otras alteraciones nucleares (Dey et al., 2024; Dakade et al., 2020).

Es importante señalar que estos resultados reflejan la respuesta durante un período de exposición de 19 días sin alimentación, lo que pudo haber influido en el comportamiento de los peces. De hecho, se registraron episodios de agresión y canibalismo, especialmente en el grupo control, lo que explicaría la mayor mortalidad observada en este grupo.

En contraste, los peces expuestos a agua contaminada mostraron menor actividad natatoria y una reducción en la respuesta a estímulos, posiblemente debido a alteraciones en la neurotransmisión y efectos depresores de los metales pesados sobre el sistema nervioso central (Loro et al., 2012). Por tanto, no puede descartarse que una estrategia experimental con suministro de alimento podría reducir estos efectos conductuales y permitir una evaluación más prolongada del daño genético en condiciones más estables.

Es importante destacar que los resultados obtenidos en este estudio reflejan únicamente la respuesta genotóxica en juveniles de *Oreochromis niloticus* bajo condiciones controladas de laboratorio. Por tanto, estos hallazgos no deben extrapolarse directamente a otras especies acuáticas, ni al ecosistema en su conjunto, ya que la sensibilidad del daño genético puede variar considerablemente entre taxones, etapas de desarrollo y condiciones ecológicas. Para una evaluación integral del impacto ambiental del río Siete, se requiere incluir múltiples niveles biológicos y especies representativas de diferentes nichos ecológicos.



Conclusiones

Estos hallazgos resaltan la necesidad de evaluar múltiples factores en los estudios de impacto ambiental. Aunque la contaminación del río Siete mostró un efecto genotóxico claro en *O. niloticus*, la supervivencia estuvo influenciada por el ayuno y el comportamiento intraspecífico. Se enfatiza la importancia de un monitoreo ambiental sistemático con bioindicadores como *O. niloticus* para evaluar la contaminación por metales pesados en ecosistemas acuáticos. Aunque los peces pueden desarrollar mecanismos de detoxificación, la exposición crónica a estos contaminantes puede alterar su fisiología y comprometer la estabilidad de las comunidades acuáticas. En este contexto, el ensayo de micronúcleos se consolida como una herramienta clave para la evaluación del riesgo ambiental y el desarrollo de estrategias de conservación (Rubio-Vargas et al., 2024).

Agradecimientos

Los autores expresan su sincero agradecimiento al Departamento de Acuicultura de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala, Ecuador, por el apoyo logístico y la disposición de los laboratorios y a la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado de la Universidad de Panamá, quien gestionó el apoyo financiero mediante los fondos CUFI, sinergia que hizo posible la realización de la investigación, su colaboración fue fundamental para el desarrollo exitoso del estudio.

Referencias Bibliográficas

- Ahmed, M.K., Habibullah-Al-Mamun, M., Hossain, M.A., Arif, M., Parvin, E., Akter, M.S., Khan, M.S., Islam, M.M. 2011. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. Chemosphere.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.025>
- Alsherif, E. A., Al-Shaikh, T. M., & AbdElgawad, H. (2022). Heavy metal effects on



- biodiversity and stress responses of plants inhabiting contaminated soil in khulais, Saudi Arabia. *Biology*, 11(2), 164.
<https://doi.org/10.3390/biology11020164>
- Anetor, G. O., Nwobi, N. L., Igharo, G. O., Sonuga, O. O., & Anetor, J. I. (2022). Environmental pollutants and oxidative stress in terrestrial and aquatic organisms: Examination of the total picture and implications for human health. *Frontiers in Physiology*, 13, 931386.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2022.931386>
- Appleton, J. D., Williams, T. M., Orbea, H., & Carrasco, M. (2001). *Water, air, and soil pollution*, 131(1/4), 19-39. <https://doi.org/10.1023/a:1011965430757>
- Arce Uribe, E., & Olivares-Rubio, H. F. (2022). Contaminantes y su efecto en el comportamiento de los peces cíclidos. *Inventio*, 17(43), 1-6.
<https://doi.org/10.30973/inventio/2021.17.43/3>
- Bancel, S., Cachot, J., Bon, C., Rochard, É., & Geffard, O. (2024). A critical review of pollution active biomonitoring using sentinel fish: Challenges and opportunities. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 360(124661), 124661. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.124661>
- Bolognesi, C., & Hayashi, M. (2011). Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26(1), 205-213. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq073>
- Briffa, J., Sinagra, E., & Blundell, R. (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*, 6(9), e04691. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>
- Chatha, A. M. M., Naz, S., Iqbal, S. S., Kiran, A., Lateef, M., Zahra, U., Yasmin, F., Amjad, N., & Javaid, A. (2023). Detection of DNA Damage in Fish using Comet Assay. *Current Trends in OMICS*, 4(1), 01-16.
<https://doi.org/10.32350/cto.41.01>
- Dey, K. K., Kamila, S., Das, T., & Chattopadhyay, A. (2024). Lead induced genotoxicity and hepatotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) at environmentally relevant concentration: Nrf2-Keap1 regulated stress response and expression of biomarker genes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 107(104396), 104396.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2024.104396>

- Faita, F., Cori, L., Bianchi, F., & Andreassi, M. G. (2013). Arsenic-induced genotoxicity and genetic susceptibility to arsenic-related pathologies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(4), 1527-1546. <https://doi.org/10.3390/ijerph10041527>
- Gallo, S., Leonetti, F. L., Reinerio, F. R., Micarelli, P., Passarelli, L., Giglio, G., Milazzo, C., Imbrogno, S., Barca, D., Bottaro, M., & Sperone, E. (2025). Bioaccumulation patterns in different tissues of twelve species of elasmobranchs from the Tyrrhenian and Ionian sea (Calabria, southern Italy). *Environments*, 12(1), 12. <https://doi.org/10.3390/environments12010012>
- Garnica Acuña, S. J., López Herrera, M., Romero Bautista, L., & Meza Sánchez, M. (2020). Efecto genotóxico y citotóxico del plomo en meristemos radiculares de dos variedades de Vicia faba L. y su relación con la domesticación. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 8(2), 73-82. <https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v8i2.181>
- Gyori, B.M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P.S., Hsu, D. & Clement, M.V. (2014). OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*, e, 457-465. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.020>
- Herdoíza, D. L., Fierro-Renoy, V., & Fierro-Renoy, C. (2017). Minería a Gran Escala, Una Nueva Industria para Ecuador. *Polémika*, 5(12). <https://revistas.usfq.edu.ec/index.php/polemika/article/view/956>
- Iordache, A. M., Nechita, C., Zgavarogea, R., Voica, C., Varlam, M., & Ionete, R. E. (2022). Accumulation and ecotoxicological risk assessment of heavy metals in surface sediments of the Olt River, Romania. *Scientific Reports*, 12(1), 880. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04865-0>
- Jiang, N., Naz, S., Ma, Y., Ullah, Q., Khan, M. Z., Wang, J., Lu, X., Luosang, D.-Z., Tabassum, S., Chatha, A. M. M., & Basang, W.-D. (2023). An overview of comet assay application for detecting DNA damage in aquatic animals. *Agriculture*, 13(3), 623. <https://doi.org/10.3390/agriculture13030623>
- Kakade, A., Salama, E.-S., Pengya, F., Liu, P., & Li, X. (2020). Long-term exposure of high concentration heavy metals induced toxicity, fatality, and gut microbial dysbiosis in common carp, *Cyprinus carpio*. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 266(Pt 3), 115293. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115293>

- Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P., & Jha, A. N. (2009). Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology*, 25(1), 53-64. <https://doi.org/10.1007/s10565-007-9043-9>
- Kumar, M., Singh, S., Jain, A., Yadav, S., Dubey, A., & Trivedi, S. P. (2024). A review on heavy metal-induced toxicity in fishes: Bioaccumulation, antioxidant defense system, histopathological manifestations, and transcriptional profiling of genes. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 83, 127377. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2023.127377>
- Langie, S. A. S., Azqueta, A., & Collins, A. R. (2015). The comet assay: past, present, and future. *Frontiers in Genetics*, 6, 266. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00266>
- Loro, V. L., Jorge, M. B., Silva, K. R. D., & Wood, C. M. (2012). Oxidative stress parameters and antioxidant response to sublethal waterborne zinc in a euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*: Protective effects of salinity. *Aquatic Toxicology*, 110–111, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.01.012>
- Lu, Y., Liu, Y., & Yang, C. (2017). Evaluating in vitro DNA damage using comet assay. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 128. <https://doi.org/10.3791/56450>
- Matute Sánchez, E. N., & Medina Peña, R. (2025). La actividad minera y sus consecuencias en el Ecuador. *METANOIA: REVISTA DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN*, 11(1), 139-154. <https://doi.org/10.61154/metanoia.v11i1.3847>
- McKelvey-Martin, V. J., Green, M. H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B. L., De Méo, M. P., & Collins, A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation Research*, 288(1), 47-63. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(93\)90207-v](https://doi.org/10.1016/0027-5107(93)90207-v)
- Nandhakumar, S., Parasuraman, S., Shanmugam, M. M., Rao, K. R., Chand, P., & Bhat, B. V. (2011). Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay). *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 2(2), 107-111. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.81903>
- Nirchio, M., Ventimilla, O. J. C., Cordero, P. F. Q., Hernández, J. G., & Oliveira, C. (2019). Genotoxic effects of mercury chloride on the Neotropical fish *Andinoacara rivulatus* (Cichlidae: Cichlasomatini). *Revista de Biología Tropical*, 67(4), 745-754. <https://doi.org/10.15517/rbt.v67i4.34133>



- Ogola, H. J. O., Debipersadh, S., & Semanya, K. (2025). Heavy metals bioaccumulation and critical risk analysis in the endemic crustacean *Callinassa kraussi* Stebbing and edible fish *Pomadasys commersonnii* from Durban Harbour, South Africa. *Journal of Food Composition and Analysis: An Official Publication of the United Nations University, International Network of Food Data Systems*, 139, 107103. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.107103>
- Rama Jyothi, N. (2021). Heavy metal sources and their effects on human health. En *Heavy Metals - Their Environmental Impacts and Mitigation*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95370>
- Riani, E., Butet, N. A., Asori, M., Setiyadi, B., & Cordova, M. R. (2025). *Impact of heavy metal waste from bottom ash residue of used battery recycling in Cinangka Village: Environmental Effects, Bioaccumulation in Sulcospira testudinaria and Health Risk Assessment*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.5071760>
- Rubio-Vargas, D. A., Morais, T. P. de, Randi, M. A. F., Filipak Neto, F., Martins, C. de C., Oliveira, A. P., Nazário, M. G., Ferreira, F. C. A. da S., Opuskevitch, I., Penner, D., Esquivel-Muelbert, J., Prodocimo, M. M., Choueri, R. B., & Oliveira Ribeiro, C. A. de. (2024). Pollutant bioaccumulation in sentinel fish chronically exposed in Iguaçu river reservoirs (Southern Brazil) and human health risk of fish consumption. *Chemosphere*, 349(140812), 140812. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140812>
- Saidon, N. B., Szabó, R., Budai, P., & Lehel, J. (2024). Trophic transfer and biomagnification potential of environmental contaminants (heavy metals) in aquatic ecosystems. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 340(Pt 1), 122815. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122815>
- Sánchez-Olivares, M. A., Gaytán-Oyarzun, J. C., Prieto-García, F., & Cabrera-Cruz, R. B. E. (2021). Evaluación Rápida de Potencial de Riesgo Genotóxico (ERPRG) asociada a metales pesados en agua potable: Caso de estudio Zimapán, Hidalgo, México. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 9(17), 114-120. <https://doi.org/10.29057/icbi.v9i17.7140>
- Sarasamma, S., Audira, G., Juniardi, S., Sampurna, B., Liang, S. T., Hao, E., Lai, Y. H., & Hsiao, C. D. (2018). Zinc chloride exposure inhibits brain acetylcholine levels, produces neurotoxic signatures, and diminishes memory and motor activities in adult zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3195. <https://doi.org/10.3390/ijms19103195>
- Sheskin, D. J. (2007). *Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures* (4.^a ed.). Chapman & Hall/CRC.



- Shetty, B. R., Jagadeesha, P. B., & Salmataj, S. A. (2025). Heavy metal contamination and its impact on the food chain: exposure, bioaccumulation, and risk assessment. *CyTA - Journal of Food*, 23(1). <https://doi.org/10.1080/19476337.2024.2438726>
- Schroeder, P., Lloyd, R., McKimm, R., Metselaar, M., Navarro, J., O'Farrell, M., ... & Mocho, J. P. (2021). Anaesthesia of laboratory, aquaculture and ornamental fish: Proceedings of the first LASA-FVS Symposium. *Laboratory Animals*, 55(4), 317-328. <https://doi.org/10.1177/0023677221998403>
- Simoniello, M. F., Gigena, F., Poletta, G., Loteste, A., Kleinsorge, E., Campana, M., Scagnetti, J., & Parma, M. J. (2009). Alkaline comet assay for genotoxic effect detection in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(2), 155-158. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9771-z>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (2011). *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. W.H. Freeman and Company. <https://play.google.com/store/books/details?id=1wb1nQEACAAJ>
- Sun, Y., Zhang, X., Peng, H., Zhou, W., Jiang, A., Zhou, F., Wang, H., & Zhang, W. (2025). Development of a coupled model to simulate and assess arsenic contamination and impact factors in the Jinsha River Basin, China. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 147, 50-61. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2023.09.038>
- Tasneem, S., & Yasmeen, R. (2018). Evaluation of genotoxicity by comet assay (single-cell gel electrophoresis) in tissues of the fish *Cyprinus carpio* during sub-lethal exposure to Karanjin. *Journal of Basic & Applied Zoology*, 79(1). <https://doi.org/10.1186/s41936-018-0033-7>
- Yunus, K., Zuraidah, M. A., & John, A. (2020). A review on the accumulation of heavy metals in coastal sediment of Peninsular Malaysia. *Ecofeminism and Climate Change*, 1(1), 21-35. <https://doi.org/10.1108/efcc-03-2020-0003>