

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**“Efecto del cloruro de mercurio sobre la
regeneración celular de la planaria de agua
dulce *Girardia festae* (Borelli, 1898)
(Tricladida: Dugesiidae)”**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en
Biología

Alexandra Belén Canales Chávez

Lima, Perú

2017

DEDICATORIA

Dedicado a la memoria de mis abuelos. Siempre fueron una inspiración en mi vida. Mis logros son en su honor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios por darme la oportunidad de estudiar esta estupenda carrera.

A mis padres por creer en mí y en mis capacidades desde el inicio de mi vida universitaria.

A mis profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas por confiar en mí, darme fortaleza y alimentar mi perseverancia.

A mis asesores por todo el apoyo brindado durante este proceso de elaboración de la tesis y por su paciencia.

A mis amigos por las alegrías infinitas que me hicieron vivir durante mi estancia en la Universidad.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	3
INDICE	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN	10
II. MARCO TEÓRICO	12
2.1. Regeneración	12
2.2. Actividad mitótica en la Regeneración	12
2.3. Toxicidad del mercurio	13
2.4. Toxicidad del Cloruro de mercurio HgCl ₂	14
2.5. Actividad de la colchicina	14
III. ANTECEDENTES	15
IV. HIPÓTESIS	17
V. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1. Lugar de ejecución	19
5.2. Operacionalización de las variables	19
5.3. Muestreo	19
5.4. Procedimientos	20
5.4.1. Determinación del tiempo de regeneración de <i>Girardia festae</i> en condiciones normales.	20

5.4.2.	Comparación de la regeneración en presencia de cloruro de mercurio a 0,05 ppm y 0,1 ppm.	20
5.4.3.	Análisis del número de metafases en condiciones normales y en condiciones experimentales	21
5.4.4.	Análisis de datos	21
VI.	RESULTADOS	22
VII.	DISCUSIÓN	24
VIII.	CONCLUSIONES	26

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PORCENTAJE DE LETALIDAD DE LAS PLANARIAS EN LOS 3 TRATAMIENTOS.	30
TABLA 2. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LA LONGITUD DEL GRUPO CONTROL EN EL PRIMER, TERCER Y SEXTO DÍA DE EVALUACIÓN.	30
TABLA 3. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LA LONGITUD DEL GRUPO EXPERIMENTAL (0,05ppm) EN EL PRIMER, TERCER Y SEXTO DÍA DE EVALUACIÓN.	31
TABLA 4. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DEL CRECIMIENTO DIARIO DE LAS PLANARIAS SEGÚN GRUPOS CONTROL Y EXPERIMENTAL (0,05ppm) EN EL PRIMER, TERCER Y SEXTO DÍA DE EVALUACIÓN.	32
TABLA 5. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LA LONGITUD TOTAL (mm) DE LAS PLANARIAS, SEGÚN GRUPOS	33
TABLA 6. PRUEBA t PARA MUESTRAS INDEPENDIENTES PARA LAS LONGITUDES	33
TABLA 7. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LAS METAFASES (%) EN EL TERCER DIA, SEGÚN GRUPOS	37
TABLA 8. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LAS METAFASES (%) EN EL SEXTO DIA, SEGÚN GRUPOS	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. LONGITUD EN MILÍMETROS DE LOS GRUPOS CONTROL Y EXPERIMENTAL EN EL PRIMER, TERCER Y SEXTO DÍA.	31
Fig. 2. CRECIMIENTO DIARIO DE LOS GRUPOS CONTROL Y EXPERIMENTAL	32
Fig. 3. DIAGRAMA DE CAJAS DE LA LONGITUD (mm) DE LAS PLANARIAS EN EL PRIMER DÍA, SEGÚN GRUPOS.	34
Fig. 4. DIAGRAMA DE CAJAS DE LA LONGITUD (mm) DE LAS PLANARIAS EN EL SEGUNDO DÍA, SEGÚN GRUPOS.	34
Fig. 5. DIAGRAMA DE CAJAS DE LA LONGITUD (mm) DE LAS PLANARIAS EN EL TERCER DÍA, SEGÚN GRUPOS.	35
Fig. 6. DIAGRAMA DE CAJAS DE LA LONGITUD (mm) DE LAS PLANARIAS EN EL CUARTO DÍA, SEGÚN GRUPOS.	35
Fig. 7. DIAGRAMA DE CAJAS DE LA LONGITUD (mm) DE LAS PLANARIAS EN EL QUINTO DÍA, SEGÚN GRUPOS.	36
Fig. 8. DIAGRAMA DE CAJAS DE LA LONGITUD (mm) DE LAS PLANARIAS EN EL SEXTO DÍA, SEGÚN GRUPOS.	36
Fig. 9. CRECIMIENTO DEL BLASTEMA AL TERCER DÍA, GRUPO EXPERIMENTAL 0,05ppm HgCl₂	38
Fig. 10. CRECIMIENTO DEL BLASTEMA AL TERCER DÍA, GRUPO CONTROL	38
Fig. 11. CRECIMIENTO DEL BLASTEMA AL SEXTO DÍA, GRUPO EXPERIMENTAL 0,05ppm HgCl₂	39
Fig. 12. CRECIMIENTO DEL BLASTEMA AL SEXTO DÍA, GRUPO CONTROL	39
Fig. 11. OBSERVACIÓN DE CÉLULAS EN ESTADO DE METAFASE, AL TERCER DÍA DE EXPOSICIÓN CONTROL. (400X)	40
Fig. 12. OBSERVACIÓN DE CÉLULAS EN ESTADO DE METAFASE, AL TERCER DÍA DE EXPOSICIÓN 0,05ppm HgCl₂. (1000X)	40
Fig. 13. OBSERVACIÓN DE CÉLULAS EN ESTADO DE METAFASE, AL SEXTO DÍA DE EXPOSICIÓN CONTROL. (400X)	41
Fig. 14. OBSERVACIÓN DE CÉLULAS EN ESTADO DE METAFASE, AL SEXTO DÍA DE EXPOSICIÓN 0,05ppm HgCl₂. (400X)	41

RESUMEN

Se evaluó el efecto del cloruro de mercurio en la regeneración celular de especímenes de *Girardia festae*. Se utilizaron 54 especímenes de *Girardia festae* colectados en la localidad de Obrajillo, Canta (11°27'10"S 76°37'19"O) las cuales fueron trasladadas al Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma. Ya en el laboratorio, las planarias fueron expuestas a dos medios experimentales de cloruro de mercurio (HgCl_2) y un grupo control. Para determinar el efecto del HgCl_2 sobre la regeneración celular de los especímenes, se analizó el crecimiento y la longitud durante los días de experimentación. Se observó también, el número de metafases del blastema expuesto a colchicina. Se determinó el tiempo de regeneración celular de los individuos en condiciones normales; se comparó la regeneración en los medios experimentales de 0,05 ppm y 0,1 ppm de cloruro de mercurio con el grupo control y se analizó el número de metafases en los tratamientos mencionados. Se determinó de letalidad de la concentración 0,1 ppm. El tiempo de regeneración para el grupo control y la concentración 0,05ppm fue de 144 horas (6 días). Se determinaron diferencias significativas en las longitudes medias entre los dos grupos en el día 6. El porcentaje de metafases también tuvo diferencias significativas en los dos días de observación entre ambos grupos. El tiempo de regeneración celular de *Girardia festae* fue de seis días en condiciones normales para 10 individuos (56%), en presencia de cloruro de mercurio a 0,05 ppm fue de seis días para 8 individuos (39%), mientras que los 18 individuos (100%) en el medio de 0,1 ppm no sobrevivieron para el segundo día de observación.

Palabras clave: *regeneración celular, planaria, cloruro de mercurio, metafase*

ABSTRACT

The effect of mercury chloride on the cellular regeneration of specimens of *Girardia festae* was evaluated. A total of 54 specimens of *Girardia festae* were collected from the locality of Obrajillo, Canta (11°27'10"S 76°37'19"W), which were transferred to the Animal Biotechnology Laboratory, Faculty of Biological Sciences, Ricardo Palma University. Already in the laboratory, planarias were exposed to two experimental media of mercury chloride (HgCl₂) and a control group. To determine the effect of HgCl₂ on cell regeneration of the specimens, growth and length were analyzed during the days of experimentation. The number of metaphases of the blastema exposed to colchicine was also observed. The cell regeneration time of individuals under normal conditions was determined; The regeneration in the experimental media of 0,05 ppm and 0,1 ppm of mercury chloride was compared with the control group and the number of metaphases in the treatments mentioned was analyzed. It was determined lethality of the concentration 0,1 ppm. The regeneration time for the control group and the 0.05ppm concentration was 144 hours (6 days). Significant differences were found in mean lengths between the two groups at day 6. The percentage of metaphases also had significant differences in the two days of observation between both groups. The cellular regeneration time of *Girardia festae* was six days in normal conditions for 10 individuals (56%); in the presence of mercury chloride at 0.05 ppm it was six days for 8 individuals (39%), while the 18 individuals (100%) in the medium of 0.1 ppm did not survive by the second day of observation.

Key words: *cell regeneration, planaria, mercury chloride, metaphase*

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se vienen suscitando diversos problemas de contaminación por metales pesados tales como cobre, cadmio, cobalto, cromo, plomo y mercurio. Este último se presenta en las cadenas tróficas con características toxicológicas diferentes de acuerdo a la forma en la que se encuentre ya sea orgánica o inorgánica. El mercurio es un metal que se encuentra presente de forma elemental, inorgánica y orgánica. Todas las formas son tóxicas para casi todos los miembros del reino animal, siendo el grado de toxicidad dependiente de la forma en la que se encuentre el Hg, el tiempo y la ruta de exposición. Las vías de exposición primarias del mercurio incluyen inhalación, absorción cutánea e ingestión. En el medio acuático, el mercurio puede encontrarse expuesto en diferentes concentraciones dependiendo de la hidrología y geología del ambiente. Las fuentes de contaminación pueden ser naturales o antropogénicas según su uso como fungicida, herbicida, en la industria de pinturas y pilas, la combustión de carbones y lo que más se destaca en nuestro país, los vertimientos de las mineras.

Las planarias son platelmintos que constituyen uno de los ejemplos más interesantes porque son capaces de regenerar un organismo completo a partir de un pequeño trozo de casi cualquier parte de su cuerpo. Después de la amputación, los neoblastos de las planarias (células madre adultas) proliferan para dar lugar a una masa de tejido no pigmentado llamado blastema, donde las partes faltantes se diferenciarán, este proceso se denomina morphallaxis y permite que la remodelación de las poblaciones celulares que se van diferenciando se integren con las preexistentes y de este modo restaurar adecuadamente las nuevas proporciones del cuerpo del animal.

Los problemas de contaminación ambiental por acción de metales pesados, como el mercurio, requieren de la búsqueda de bioindicadores a través de los cuales se puede evaluar el nivel de contaminación que ejercen. El modelo planaria de agua dulce, es el más adecuado puesto que posee hipersensibilidad frente a cambios en su medio.

En este contexto, la siguiente investigación tiene como objetivo establecer una relación entre la presencia de distintas concentraciones de cloruro de mercurio y la regeneración celular en el modelo planaria de agua dulce, porque existen evidencias que la toxicidad del mercurio perturba los mecanismos homeostáticos de los sistemas vivientes; en el caso de *Girardia festae* posiblemente afectando los procesos de multiplicación celular de los neoblastos. Esto se determinará mediante la observación del crecimiento del blastema de los especímenes cortados, expuestos a los diferentes tratamientos y la observación de la proliferación celular.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Regeneración

La regeneración es la sustitución del tejido perdido, por otro igual que conserva la estructura y funcionalidad del original; es una característica propia de numerosos invertebrados y de algunas estructuras de ciertos vertebrados adultos, principalmente anamniotas (peces y anfibios). (Durán 2009)

Han pasado más de 200 años desde los primeros experimentos del poder de regeneración de planarias. Estos pequeños animales, son probablemente hermafroditas. Se observaron restituciones de la porción anterior de las planarias cortadas, a partir de una sección delgada y transparente a comparación del resto del cuerpo. (Pallas 1774)

Inicialmente, se describieron dos maneras generales en las que la regeneración podía tener lugar, aunque los dos procesos eran distintos, podían aparecer combinados en la misma forma. Estos casos fueron propuestos como epimorfosis, en la cual la proliferación de material precede el desarrollo de la nueva parte; y la morfallaxis, en la que una parte se transforma directamente en un nuevo organismo, o parte de un organismo sin proliferación en las superficies cortadas. (Morgan 1901)

2.2. Actividad mitótica en la Regeneración

La mayoría de la evidencia sugiere que el único tipo de células de las planarias dotadas de poder mitótico son los neoblastos. (Bronsted 1969)

Durante las primeras horas de regeneración, se observa una explosión local de actividad mitótica cerca del área de la herida. Debajo de la herida, los neoblastos del epitelio se acumulan y dejan de dividirse, mientras que

los neoblastos proximales, cercanos a la herida (región post-blastema), se dividen continuamente y migran distalmente. Esta acumulación de neoblastos es visible externamente debido su naturaleza no pigmentada, y produce la regeneración tejido conocido como blastema. (Saló 2006).

2.3. Toxicidad del mercurio

La toxicología ambiental permite analizar las diferentes formas de contaminación, evaluando la naturaleza de los contaminantes y las dosis que producen ciertos efectos tóxicos o nocivos en los distintos niveles organizacionales de los seres vivos (Capó 2002).

En los ambientes contaminados por metales pesados se altera la capacidad de supervivencia de los organismos, lo que afecta la dinámica poblacional de las especies y, por tanto, la estructura y función ecosistémica. (Posada y Arroyave 2006)

El mercurio es un metal que por su naturaleza presenta alta persistencia en el ambiente, se bioacumula y biomagnifica y actúa como un disruptor endocrino en bajas concentraciones. (Muñoz y Palacio 2010). Se considera poco peligroso en forma metálica y en sales minerales, pero en compuestos orgánicos su acción se torna muy tóxica para el hombre como último consumidor de pescados y mariscos, que tienen la propiedad de acumularlo en sus tejidos (Roldán 1992).

Posee una tendencia absorbente, y esto hace que los procesos de adsorción y desorción en sólidos sean importantes para comprender la distribución y el impacto de este elemento en los ecosistemas acuáticos (Casas 1998). Muchos estudios y pruebas ecotoxicológicas, han aportado a lo largo de los años la información necesaria para establecer el modo de acción y los efectos específicos de los contaminantes sobre componentes bióticos. (Tortorelli *et al*, 1994) Debido a su afinidad con los grupos sulfhidrilos, el mercurio tiene la capacidad de inhibir los puentes

disulfuros, causando cambios en la estructura y función de las proteínas. (Loumbourdis y Danscher 2008).

Según estudios, por cada kilogramo de oro, al menos 1,32 kg de Hg son vertidos al ambiente, ya que para amalgamar el oro se usa una relación Hg/Au hasta 6:1 y en algunos casos 10:1 (Malm *et al*, 1990). Mientras que, en áreas alejadas de las actividades mineras se ha estimado bajas concentraciones de Hg en el agua, entre 0 y 0,003 mg/l (Marrugo y Lans 2006).

2.4. Toxicidad del Cloruro de mercurio HgCl₂

El cloruro mercúrico (HgCl₂) es una sal de peso molecular 271,53, punto de fusión 276°C y punto de ebullición 303°C (Palacio y Barrera 2002); es corrosivo y es soluble en agua, alcohol, éter y glicerina. El sublimado de HgCl₂ es cáustico y es irritante de las mucosas, por formación de albuminatos solubles. Los polvos de HgCl₂ pueden perforar la córnea por este motivo (Doadrio 2004). Es muy tóxico para organismos acuáticos, y en la industria agrícola es utilizado como fungicida e insecticida (Muñoz y Palacio 2010)

2.5. Actividad de la colchicina

La colchicina es un alcaloide soluble en agua derivado del *Colchicum autumnale* que bloquea la división celular por inhibición de la mitosis. (Larrubia *et al*, 2003)

III. ANTECEDENTES

Los metales pesados son contaminantes ambientales estables y persistentes. La determinación química de las concentraciones de metales en el agua y en los sedimentos no puede dar información acerca de la gravedad de la contaminación, especialmente en el caso de los niveles sub-letales. El control biológico utilizando especies centinela podría permitir un enfoque sensible para predecir el riesgo potencial de los contaminantes persistentes, como los metales pesados. (Guecheva *et al*, 2001)

Existen dos criterios básicos para la elección de un modelo biológico, específicamente para el estudio de la regeneración. El primero es que el animal seleccionado debe manifestar claramente el rasgo o característica de interés, en este caso, la regeneración; y el segundo criterio es que debe ser fácil de manipular en la etapa experimental. (Sánchez-Alvarado 2004)

Se ha demostrado a través de investigaciones, la capacidad regenerativa de la mayoría de integrantes del Phylum Platyhelminthes, por ello son considerados organismos biológicos importantes. Específicamente, se trata de un mecanismo de control de la pluripotencialidad celular de las células madre mesenquimales denominadas neoblastos. (Newmark y Sánchez-Alvarado 2000)

La mitosis juega un papel importante en la regeneración de las planarias para la proliferación de los neoblastos. En el blastema no se ha encontrado mitosis a pesar de que el número de células aumenta de manera constante durante la regeneración. Lo que en realidad ocurre es una acumulación temprana de células no diferenciadas en el límite de la laceración, en el caso de planarias cortadas, las cuales aumentan por la migración continua hacia el blastema. (Saló y Baguña 1984).

Debido a que se cree que estas células son las células madre de los tipos celulares más diferenciados, el estudio de los cambios en el índice mitótico de los neoblastos después de la alimentación parece de considerable interés en relación con la dinámica de crecimiento de las planarias. Se ha demostrado que el índice de mitosis se mantiene alto en planarias alimentadas a diferencia de los animales no alimentados. El crecimiento dramático de la mitosis en animales alimentados fue revelado con pruebas con colchicina. (Baguña 1974)

Existen algunos estudios parciales sobre las concentraciones letales de cloruro de mercurio en la regeneración de planarias. En un medio de 0,1 y 0,2 ppm de cloruro de mercurio, las planarias presentan anomalías morfológicas. Luego, a concentraciones de 0,08 ppm o menos, se observan solamente anomalías de comportamiento, esto es, la motilidad de los individuos. (Boyd y Morita 1982).

La toxicidad del carbofurano presente en plaguicidas, ha sido evaluada utilizando a *Girardia festae* por sus características, como la sensibilidad a contaminantes, y su facilidad para ser cultivada en el laboratorio. Se evaluaron las planarias en 3 niveles: cefálico, medio y caudal, concluyendo que, a 17 días de exposición, lograron la regeneración completa teniendo la parte media el mayor porcentaje. (Iannacone y Tejada en 2007).

IV. HIPÓTESIS

La regeneración de especímenes de planaria ocurre en concentraciones diferentes de cloruro de mercurio. Por lo que se puede inferir que: Si la regeneración celular no depende de la concentración de mercurio *entonces* este proceso se completará en concentraciones de HgCl_2 : 0,05 ppm y 0,1 ppm respectivamente.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Lugar de ejecución

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

5.2. Operacionalización de las variables

La variable independiente de esta investigación fue la concentración de HgCl_2 la cual tiene como indicador el tiempo en horas en el cual se completa la regeneración. El instrumento es la medición del crecimiento del individuo en milímetros. Las variables dependientes fueron la longitud de crecimiento de las planarias la cual se midió por el incremento de la masa del blastema y la proliferación celular medido por el análisis citológico (número de metafases).

5.3. Muestreo

Se utilizaron 54 de un total de 100 especímenes de *Girardia festae* los cuales fueron colectados en la localidad de Obrajillo, Canta ($11^{\circ}27'10''\text{S}$ $76^{\circ}37'19''\text{O}$). Se colocaron en envases de vidrio con agua del río y fueron transportadas en una caja térmica al laboratorio de biotecnología animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

5.4. Procedimientos

En el laboratorio, los especímenes fueron colocados en un envase de vidrio Pyrex® con agua de manantial, la cual fue renovada diariamente. Los especímenes fueron alimentados con hígado de pollo hasta 48 horas antes de los bioensayos.

5.4.1. Determinación del tiempo de regeneración de *Girardia festae* en condiciones normales.

Un total de 18 planarias fueron evaluadas en condiciones normales. Para el proceso de decapitación de las planarias se utilizó un estereoscopio, hielo, papel filtro y una navaja. Se colocaron las planarias sobre el hielo para ser paralizadas y con la navaja se seccionó la región cefálica de las planarias por debajo de las aurículas.

Luego de ser cortadas, todas las planarias se midieron utilizando una hoja milimetrada colocada en la base de una placa y observada mediante un estereoscopio.

5.4.2. Comparación de la regeneración en presencia de cloruro de mercurio a 0,05 ppm y 0,1 ppm.

Las soluciones de cloruro de mercurio de 0,05 ppm y 0,1 ppm fueron preparadas tomando 0,05 g y 0,1 g del compuesto para 1 litro de agua de manantial siendo equivalentes a las concentraciones previamente mencionadas, respectivamente. Para cada tratamiento se utilizaron 18 planarias.

5.4.3. Análisis del número de metafases en condiciones normales y en condiciones experimentales

Se colocaron las planarias en un medio con colchicina al tercer y sexto día durante 6 horas. Transcurridas las horas, se realizó un squash sobre una lámina portaobjetos utilizando orceína acética para finalmente ser observadas al microscopio. Se realizó el conteo, de un total de 100 células por campo para verificar el número de metafases existentes.

5.4.4. Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados mediante pruebas de ANOVA, utilizando el programa estadístico SPSS Statistics 22 ®.

VI. RESULTADOS

De un total de 54 planarias, 18 en cada uno de los tratamientos, los resultados de letalidad en cada tratamiento fueron de 18 individuos en la concentración de 0,1ppm (100%); 11 individuos en la concentración de 0,05ppm (61%) y 8 individuos en el control (44%). (Tabla 1)

El tiempo de regeneración de las planarias sobrevivientes para el grupo control fue de un total de 144 horas. (6 días)

Los estadísticos descriptivos de la longitud de las planarias en el primer, tercer y sexto día, habiendo aplicado un análisis de varianza de medidas repetidas para el grupo control, arrojaron las medias y desviación estándar indicadas en la Tabla 2, teniendo un tamaño de muestra (N=10) que fueron las planarias sobrevivientes y totalmente regeneradas al sexto día de la evaluación. Para el grupo experimental, las medias aritméticas de las longitudes demuestran diferencias mayores entre el primer, tercer y sexto día, sin embargo, el tamaño de la muestra es menor (N=7), tal y como se muestra en la Tabla 3. En la Fig. 1 se observa la diferencia entre las longitudes medias de ambos tratamientos, en el primer, tercer y sexto día de exposición.

Tal como se observa en la Tabla 4, el crecimiento promedio diario, no presenta diferencias significativas. Sin embargo, si se observan diferencias entre ambos grupos (Fig. 2), siendo el crecimiento mayor en el tratamiento con 0,05ppm de HgCl₂.

En la Tabla 5 se observan las longitudes medias de las planarias a través de los días de experimentación.

Con respecto a la comparación entre grupos, el análisis estadístico indica que las diferencias observadas de las longitudes medias entre los dos grupos, en los días 1, 2, 3, 4 y 5, no son significativas. (Tabla 6)

Las metafases fueron contadas en distintos campos observados. Por cada 100 células, se determinó el porcentaje de las metafases observadas. El análisis estadístico indica que las diferencias observadas de los porcentajes de metafases entre los dos grupos, en el tercer día, son muy significativas. ($t=4,948$; $p\text{-valor}=0,002$); del mismo modo, para el sexto día, las diferencias son muy significativas ($t=6,790$; $p\text{-valor}=0,000$)

VII. DISCUSIÓN

El uso de una especie adecuada como la planaria de agua dulce por su facilidad de manipulación y su propiedad de regeneración ayuda a determinar la letalidad y toxicidad del cloruro de mercurio a diferentes concentraciones tal y como lo proponen Guecheva (2001) y Sánchez-Alvarado (2004). Este modelo biológico, podría ser utilizado para predecir y evitar posibles riesgos de contaminación frente a los eventos que se suscitan por prácticas en las distintas actividades industriales o artesanales, que utilizan metales pesados como el mercurio en sus procesos, y cuyas descargas, llegan directa o indirectamente a los ecosistemas.

En este trabajo se determinó la letalidad de un 100% a la concentración de 0,1 ppm de cloruro de mercurio. A diferencia de lo expuesto por Boyd y Morita (1982) quienes trabajaron con cloruro de metilmercurio. En su trabajo se expone la observación de anomalías morfológicas en un medio de 0,1 ppm, más no letalidad. En concentraciones menores a 0,08 ppm de cloruro de metilmercurio, Boyd y Morita (1982) observaron anomalías de comportamiento, en este trabajo, a una concentración de 0,05 ppm de cloruro de mercurio, se presentó letalidad a un 61% de un total de 18 planarias expuestas. Esto determina un efecto distinto del mercurio, de acuerdo a su estado en la naturaleza y a su mecanismo de acción, debido a su disposición molecular.

La capacidad regenerativa de la planaria de agua dulce se evidenció con esta investigación mediante la observación del blastema, específicamente la etapa de metafase de la mitosis como evidencia de la alta proliferación. Para el caso del tratamiento experimental a 0,05 ppm de cloruro de mercurio, se observó un número mayor de metafases al sexto día de exposición a cloruro de mercurio lo cual estaría demostrando lo

mencionado por Saló y Baguña (1984) sobre la acumulación de células no diferenciadas en el límite de la laceración.

En este estudio, las planarias solo fueron alimentadas 48 horas antes de iniciado el experimento y no durante él. Esta condición fue estudiada por Baguña (1974), quien observó un crecimiento dramático de la mitosis, y por ende el crecimiento de las planarias, cuando estas fueron alimentadas frente a un control de planarias sin alimentar.

A diferencia del trabajo de Iannacone y Tejada en 2007, quienes cortaron las planarias en 3 partes y trabajaron con otro compuesto tóxico como es el carbofurano, en este trabajo, las planarias fueron seccionadas en 2 partes y sólo se observó el crecimiento de la parte posterior. La regeneración de este fragmento se dio en 6 días y no a los 17 días.

VIII. CONCLUSIONES

Se determinó que el tiempo de regeneración celular evidenciado a través del crecimiento del blastema en condiciones normales y en presencia de cloruro de mercurio al 0,05 ppm fue de 6 días.

No se evidenció la regeneración celular en presencia de cloruro de mercurio en concentración 0,1 ppm.

Se evidenció que el porcentaje de metafases en condiciones normales y en presencia de cloruro de mercurio (0,05ppm), presentó diferencias significativas respecto a la cantidad entre los días 3 y 6 del experimento.

REFERENCIAS CITADAS

1. Baguña J. 1974. Dramatic mitotic response in planarians after feeding, and a hypothesis for the control mechanism. *Journal of Experimental Zoology*, 190(1), 117-122.
2. Boyd J, Morita M. 1982. Planarians as a Model System for In Vitro Teratogenesis Studies. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 2:277 – 291
3. Bronsted H. 1969. *Planarian Regeneration*. Pergamon Press Ltd., Londres.
4. Casas JC. 1998. Influencia del tiempo y del pH en la redisolución del mercurio presente en los sedimentos del río Negro. Tesis de posgrado, Universidad de Antioquia, Facultad de Ingeniería (Posgrado de Ingeniería Ambiental), Medellín.
5. Capó M. 2002. *Principios de ecotoxicología: diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente*. McGraw-Hill. 314 p. España.
6. Doadrio A. 2004. Ecotoxicología y acción toxicológica del mercurio. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. Vol. 70, Nº 4.
7. Durán I. 2009. Modelos de Regeneración. Departamento de biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga. España. *Encuentros en la Biología*. Vol 2. Nº 122.
8. Guecheva T, Henriques J, Erdtmann B. 2001. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). *Mutation Research* 497 19-27.

9. Iannacone J, Tejada M. 2007. Empleo de la regeneración de la planaria de agua dulce *Girardia festae* (Borelli, 1898) (Tricladida: Dugesiidae) para evaluar la toxicidad del carbofurano. *Neotropical Helminthology*, vol. 1, no. 1, pp. 7-13.
10. Larrubia Y, Villamañán E, Jiménez E, Diazaraque R, Lucendo A, Fernández C, Arnalich F. 2003. Intento autolítico con colchicina. *Farm Hosp Vol.* 27 N°3, pp. 199-190. Madrid – España.
11. Loumbourdis N, Danscher G. 2008. Autometallographic tracing of Hg-S quantum dots in foros exponed to inorganic mercury. *Biometals*, 21: 311-319
12. Malm O, Pfeiffer W, Souza C, Reuther R. 1990. Mercury pollution due to gold mining in the Madeira River. *Journal of the Human Environment*, 19: 1-8.
13. Marrugo J, Lans E. 2006. Impacto ambiental por contaminación con níquel, mercurio y cadmio en aguas, peces y sedimentos en la cuenca del río San Jorge, en el departamento de Córdoba. Montería (Córdoba): Centro de Investigaciones (CIUC), Universidad de Córdoba.
14. Morgan TH. 1901. *Regeneration*. New York: Macmillan. 316 pp.
15. Muñoz E, Palacio J. 2010. Efectos del cloruro de mercurio (HgCl₂) sobre la sobrevivencia y crecimiento de renacuajos de *Dendrosophus bogerti*. *Actual Biol* 32 (93): 189 – 197.
16. Newmark P, Sánchez-Alvarado A. 2000. Bromodeoxyuridine Specifically Labels the Regenerative Stem Cells of Planarians. *Developmental Biology* 220, 142 – 153.
17. Palacio J, Barrera J. 2002. Efectos tóxicos de la exposición aguda de *Prochilodus magdalenae* a cloruro de mercurio. *Actualidades Biológicas (Colombia)* v. 24 (no. 77) p. 123-1280304-3584.

18. Pallas P. 1774. *Spicilegia zoologica quibus novae imprimis et obscurae animalium species iconibus, descriptionibus atque commentariis illustrantur: Berolini, Prostant, Apud Gottl*
19. Posada M, Arroyave M. 2006. Efectos del mercurio sobre algunas plantas acuáticas tropicales. Revista EIA, ISSN 1794-1237 Número 6, p. 57-67. Escuela de Ingeniería de Antioquía, Medellín - Colombia.
20. Roldán G. 1992. Fundamentos de limnología tropical. Editorial Universidad de Antioquia. 529 p. Medellín – Colombia.
21. Saló E. 2006. The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). BioEssays 28(5):546-559.
22. Saló E, Baguña J. 1984. Regeneration and pattern formation in planarians. J. Embryol. exp. Morph. 83, 63-80 Departament de Genetica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, Barcelona-28, Spain
23. Sánchez-Alvarado A. 2004. Regeneration and the need for simpler model organisms. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, vol. 359, pp. 759-763.
24. Tortorelli M, Di Marzio W, Sáenz M, Alberdi J. 1994. Ensayos ecotoxicológicos con organismos acuáticos para la evaluación de la contaminación ambiental. Curso de posgrado, Universidad Nacional de Luján, Departamento de Ciencias Básicas, Laboratorio de Ecotoxicología.

ANEXOS

TABLA 1. PORCENTAJE DE LETALIDAD DE LAS PLANARIAS EN LOS 3 TRATAMIENTOS.

Tratamiento	Letalidad		Sobrevivencia	
	Nº	Porcentaje	Nº	Porcentaje
CONTROL	8	44%	10	56%
HgCl ₂ 0,05ppm	11	61%	7	39%
HgCl ₂ 0,1ppm	18	100%	0	0%

TABLA 2. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LA LONGITUD DEL GRUPO CONTROL EN EL PRIMER, TERCER Y SEXTO DÍA DE EVALUACIÓN.

Longitud (mm)	Media Aritmética (mm)	Desviación Estándar (mm)	Tamaño de muestra
Longitud primer día	9,200	2,098	10
Longitud tercer día	10,200	2,741	10
Longitud sexto día	12,300	1,947	10

TABLA 3. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LA LONGITUD DEL GRUPO EXPERIMENTAL (0,05ppm) EN EL PRIMER, TERCER Y SEXTO DÍA DE EVALUACIÓN.

Longitud (mm)	Media Aritmética (mm)	Desviación Estándar (mm)	Tamaño de muestra
Longitud primer día	9,857	3,132	7
Longitud tercer día	12,000	1,826	7
Longitud sexto día	14,571	1,134	7

Fig. 1. LONGITUD EN MILÍMETROS DE LOS GRUPOS CONTROL Y EXPERIMENTAL EN EL PRIMER, TERCER Y SEXTO DÍA.

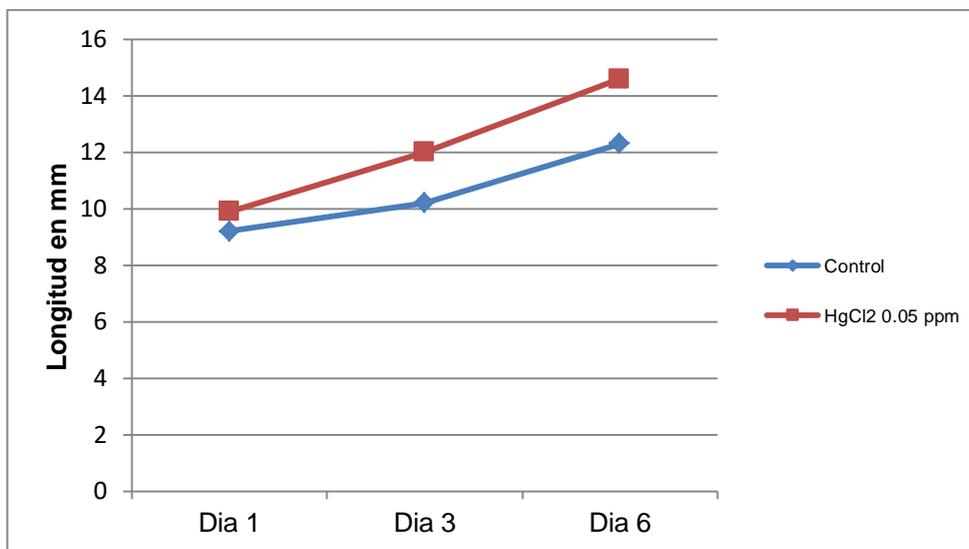


TABLA 4. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DEL CRECIMIENTO DIARIO DE LAS PLANARIAS SEGÚN GRUPOS CONTROL Y EXPERIMENTAL (0,05ppm) EN EL PRIMER, TERCER Y SEXTO DÍA DE EVALUACIÓN.

GRUPO	DÍA DE OBSERVACIÓN	Media (mm)	Desviación Estándar (mm)	Tamaño de muestra
CONTROL	Día 2	0,200	2,860	10
	Día 3	0,800	0,919	10
	Día 4	0,600	0,843	10
	Día 5	0,500	1,080	10
	Día 6	0,400	0,699	10
HgCl ₂ 0,05ppm	Día 2	0,286	0,488	7
	Día 3	1,143	1,345	7
	Día 4	1,143	1,215	7
	Día 5	1,429	1,272	7
	Día 6	0,714	0,951	7

Fig. 2. CRECIMIENTO DIARIO DE LOS GRUPOS CONTROL Y EXPERIMENTAL

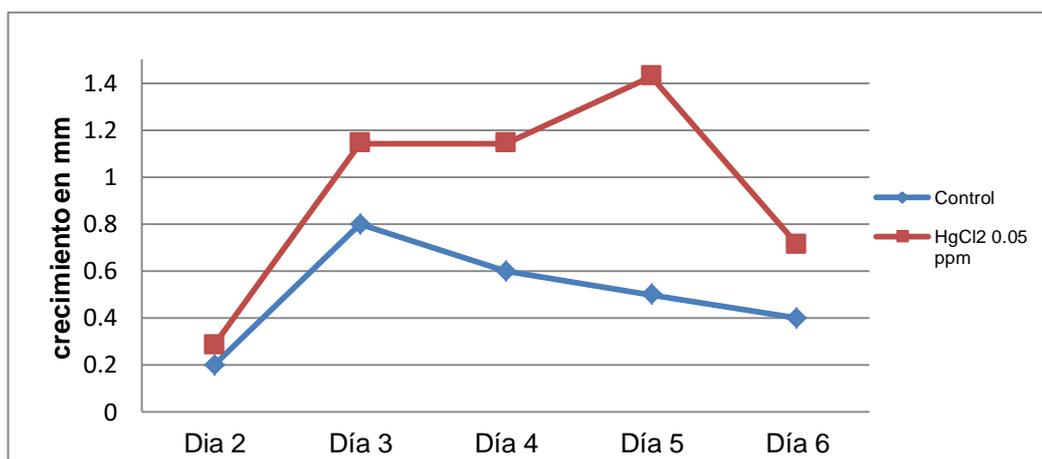


TABLA 5. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LA LONGITUD TOTAL (mm) DE LAS PLANARIAS, SEGÚN GRUPOS

Grupo	Día	Media Aritmética	Desviación Estándar	Tamaño de muestra
Control	Día 1	9,200	2,098	10
	Día 2	9,400	3,307	10
	Día 3	10,200	2,741	10
	Día 4	11,000	2,789	10
	Día 5	11,900	2,183	10
	Día 6	12,300	1,947	10
Experimental	Día 1	9,857	3,132	7
	Día 2	10,857	3,078	7
	Día 3	12,000	1,826	7
	Día 4	12,429	1,512	7
	Día 5	13,857	1,676	7
	Día 6	14,571	1,134	7

TABLA 6. PRUEBA t PARA MUESTRAS INDEPENDIENTES PARA LAS LONGITUDES

	t	Significancia
Día 1	0,520	0,61
Día 2	0,919	0,37
Día 3	1,511	0,151
Día 4	1,227	0,239
Día 5	1,990	0,239
Día 6	2,761	0,015

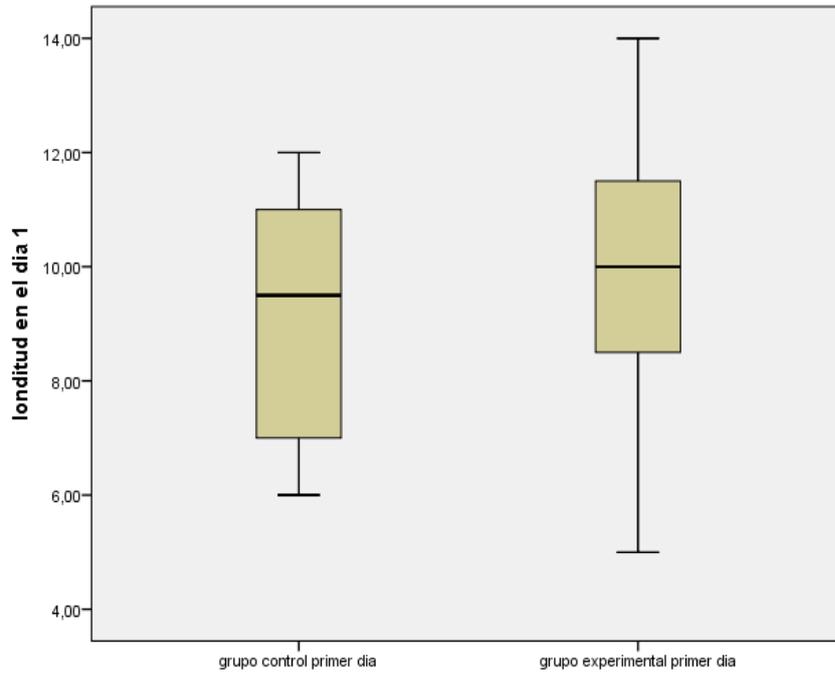


Fig. 3. DIAGRAMA DE CAJAS DE LA LONGITUD (mm) DE LAS PLANARIAS EN EL PRIMER DÍA, SEGÚN GRUPOS.

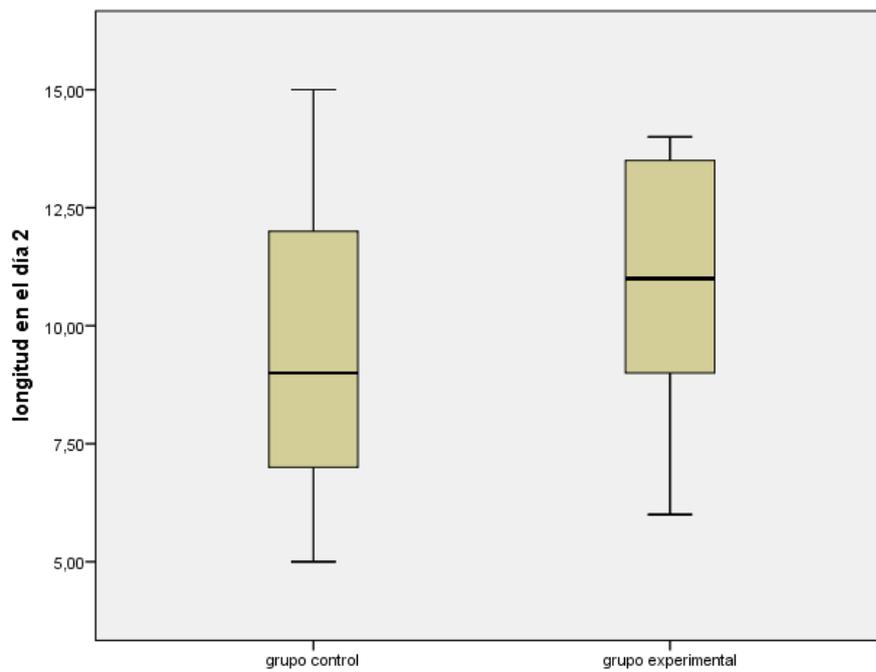


Fig. 4. DIAGRAMA DE CAJAS DE LA LONGITUD (mm) DE LAS PLANARIAS EN EL SEGUNDO DÍA, SEGÚN GRUPOS.

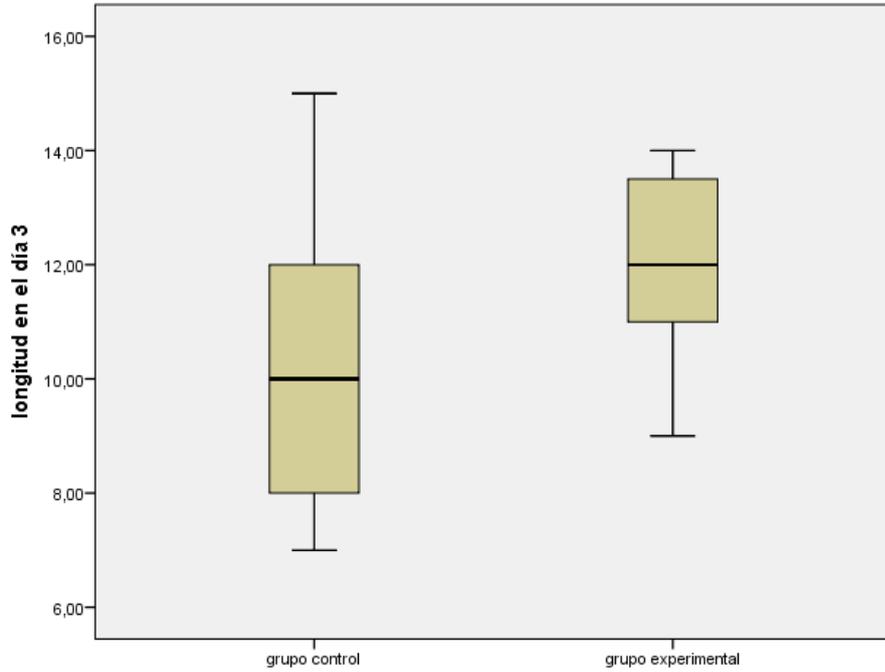


Fig. 5. DIAGRAMA DE CAJAS DE LA LONGITUD (mm) DE LAS PLANARIAS EN EL TERCER DÍA, SEGÚN GRUPOS.

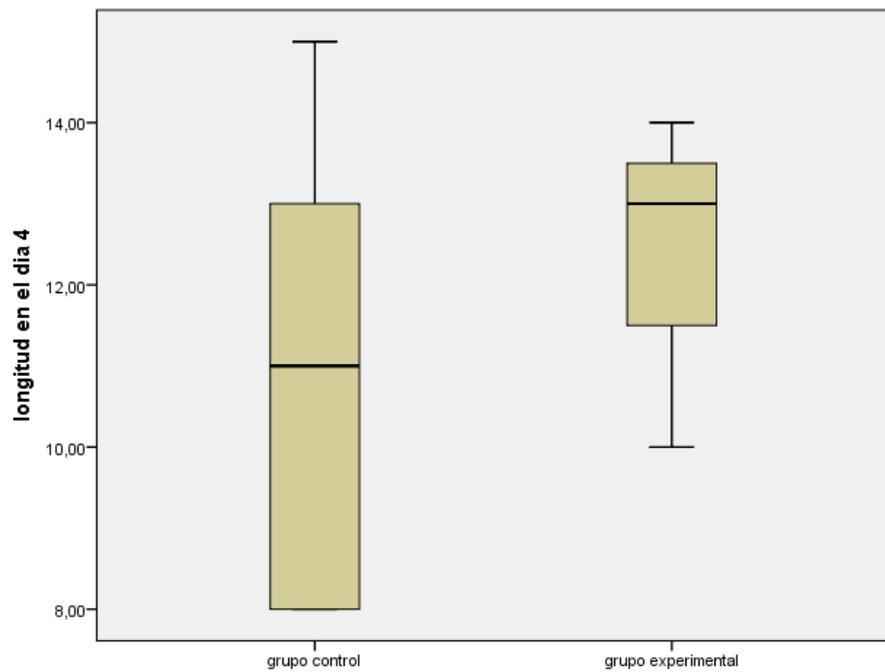


Fig. 6. DIAGRAMA DE CAJAS DE LA LONGITUD (mm) DE LAS PLANARIAS EN EL CUARTO DÍA, SEGÚN GRUPOS.

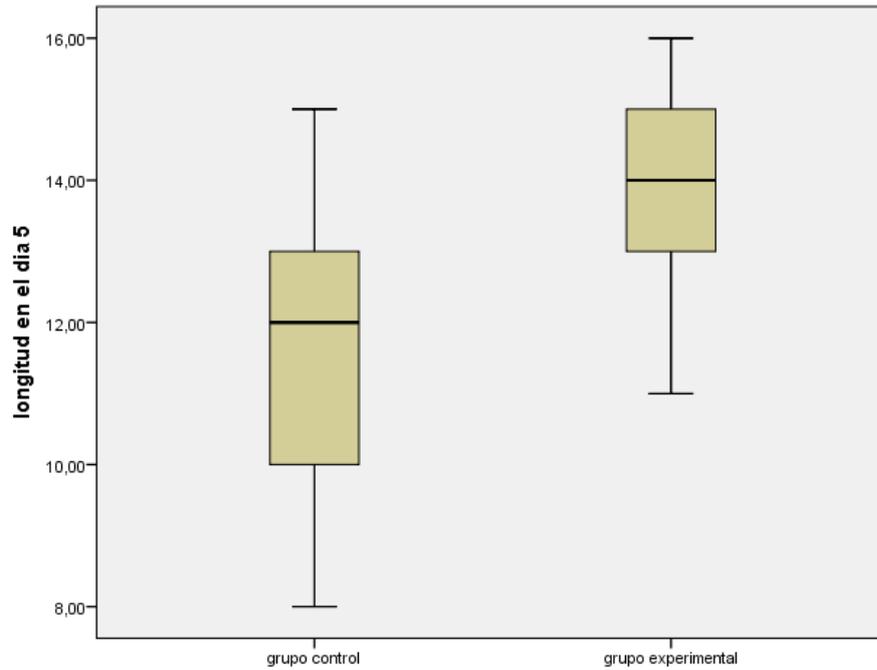


Fig. 7. DIAGRAMA DE CAJAS DE LA LONGITUD (mm) DE LAS PLANARIAS EN EL QUINTO DÍA, SEGÚN GRUPOS.

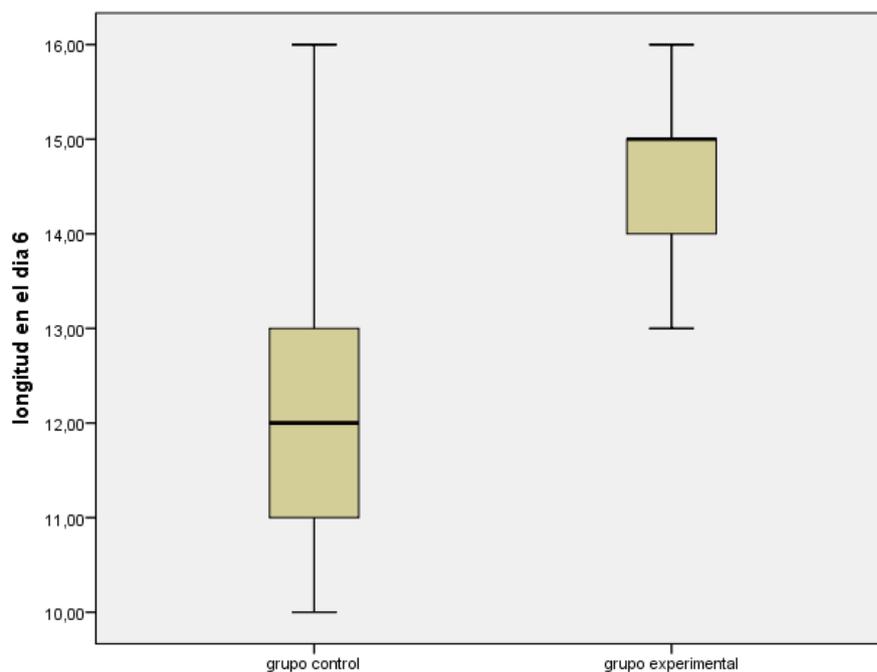


Fig. 8. DIAGRAMA DE CAJAS DE LA LONGITUD (mm) DE LAS PLANARIAS EN EL SEXTO DÍA, SEGÚN GRUPOS.

**TABLA 7. ESTADISTICAS DESCRIPTIVAS DE LAS METAFASES (%)
EN EL TERCER DIA, SEGÚN GRUPOS**

Grupo	Media Aritmética (%)	Desviación Estándar (%)	Tamaño de muestra
Control	1,37	0,85	10
Experimental	9,74	4,42	7

**TABLA 8. ESTADISTICAS DESCRIPTIVAS DE LAS METAFASES (%)
EN EL SEXTO DIA, SEGÚN GRUPOS**

Grupo	Media Aritmética (%)	Desviación Estándar (%)	Tamaño de muestra
Control	1,60	1,43	10
Experimental	7,11	1,79	7



Fig. 9. CRECIMIENTO DEL BLASTEMA AL TERCER DÍA, GRUPO EXPERIMENTAL 0,05ppm HgCl₂



Fig. 10. CRECIMIENTO DEL BLASTEMA AL TERCER DÍA, GRUPO CONTROL

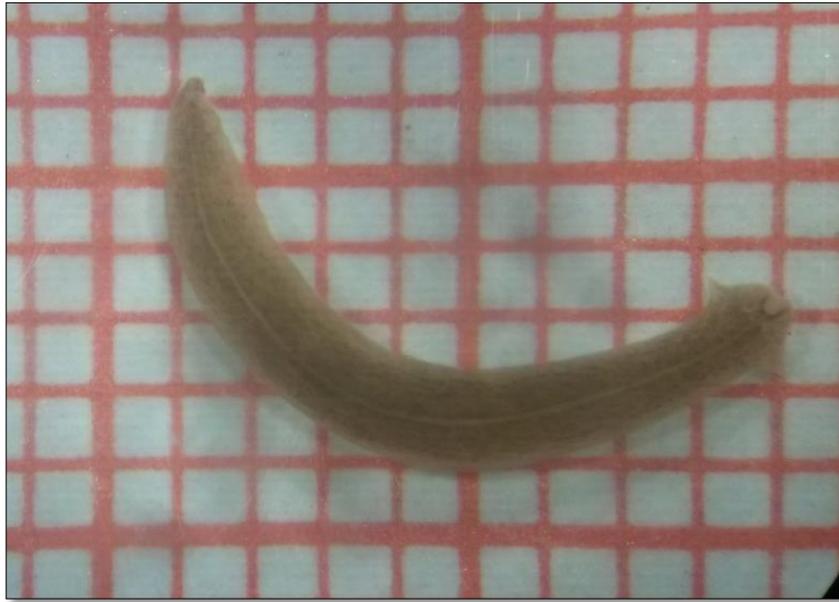


Fig. 11. CRECIMIENTO DEL BLASTEMA AL SEXTO DÍA, GRUPO EXPERIMENTAL 0,05ppm HgCl₂



Fig. 12. CRECIMIENTO DEL BLASTEMA AL SEXTO DÍA, GRUPO CONTROL

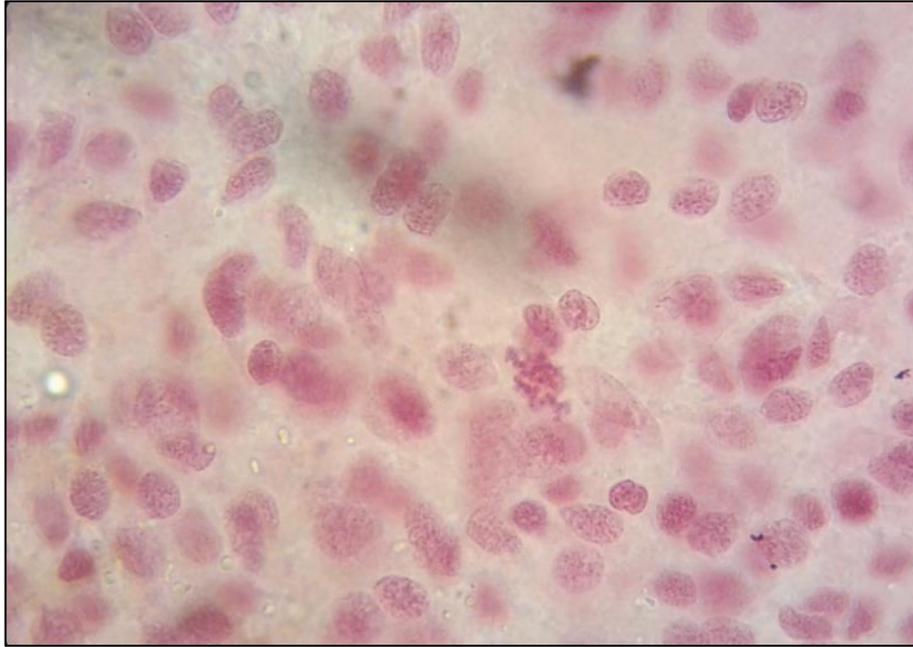


Fig. 11. OBSERVACIÓN DE CÉLULAS EN ESTADO DE METAFASE, AL TERCER DÍA DE EXPOSICIÓN CONTROL. (400X)

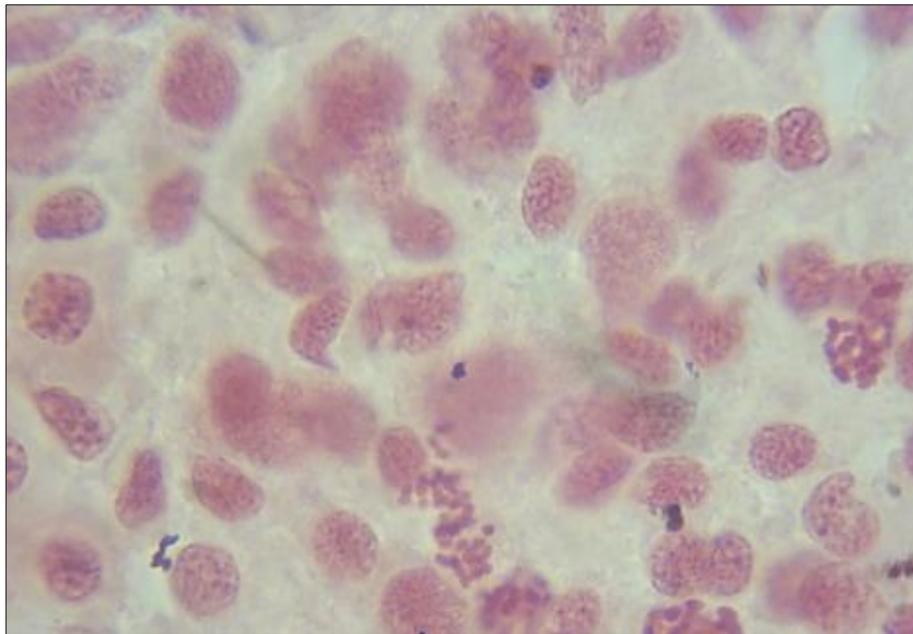


Fig. 12. OBSERVACIÓN DE CÉLULAS EN ESTADO DE METAFASE, AL TERCER DÍA DE EXPOSICIÓN 0,05ppm HgCl₂. (1000X)

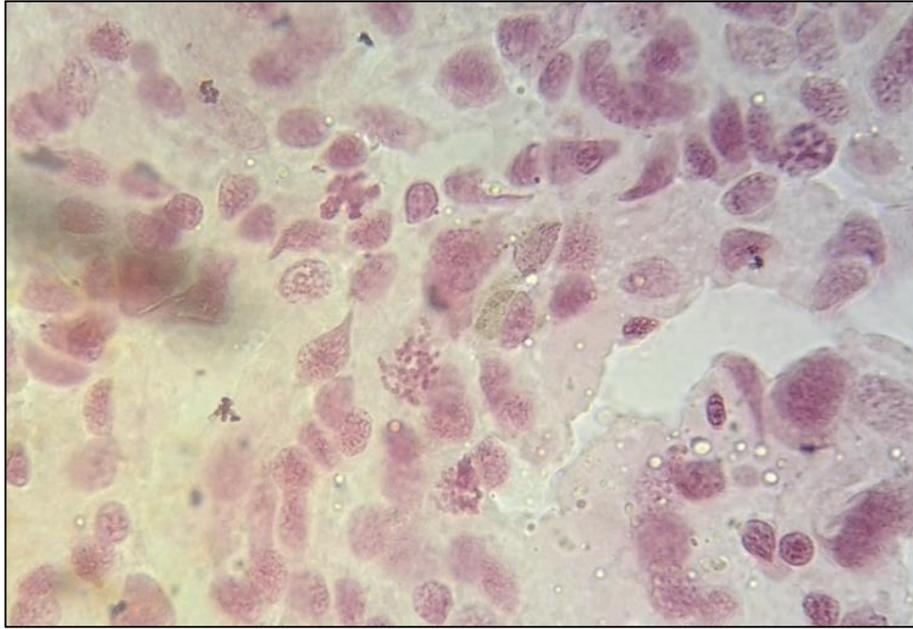


Fig. 13. OBSERVACIÓN DE CÉLULAS EN ESTADO DE METAFASE, AL SEXTO DÍA DE EXPOSICIÓN CONTROL. (400X)

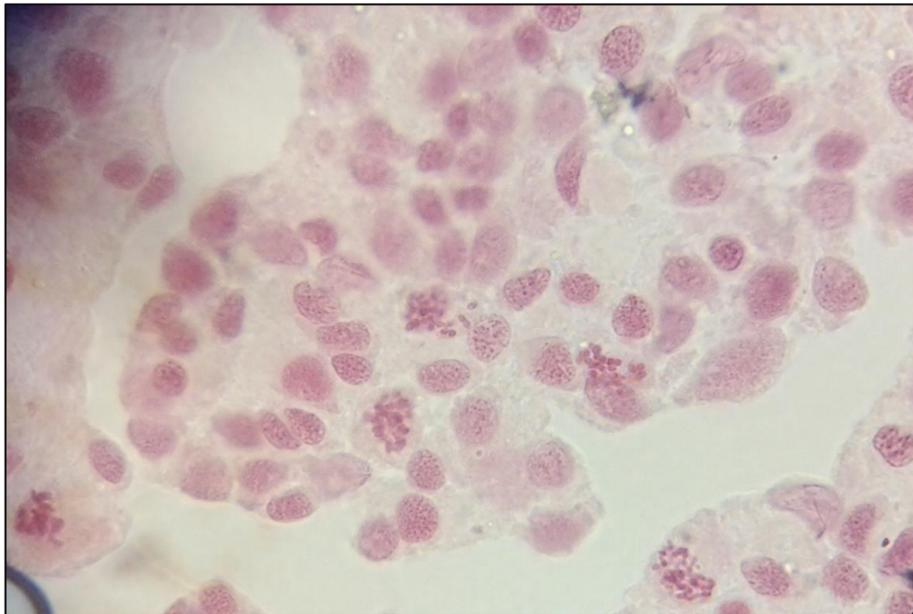


Fig. 14. OBSERVACIÓN DE CÉLULAS EN ESTADO DE METAFASE, AL SEXTO DÍA DE EXPOSICIÓN 0,05ppm HgCl₂. (400X)