

MARCADORES MOLECULARES DE DAÑO GENÉTICO EN TORTUGA VERDE (*Chelonia mydas*) DEL AREA MARINO-COSTERA PROTEGIDA CERRO VERDE E ISLAS DE LA CORONILLA, ROCHA

Borrat, V.^{1,2}; Villar, S.^{2,3}; Marquez, A.²; Martinez-Souza, G.^{1,4}; Fallabrino, A.¹ y Novello, A.³

¹Karumbé, Tortugas Marinas del Uruguay

²Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido. Facultad de Ciencias

³Sección Genética. Facultad de Ciencias

⁴Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica Universidade Federal de Rio Grande - FURG Laboratório de Estatística Ambiental - LEA

vberrat@gmail.com

Resumen:

Las tortugas marinas (Testudines, Cryptodira) son especies cosmopolitas con ciclos de vida que transcurren entre áreas de reproducción, playas de anidación y áreas de alimentación y/o desarrollo. Uruguay forma parte de una región, conocida como Atlántico Sudoccidental, de importante actividad para cinco de las siete especies de tortugas marinas que existen en el mundo. La tortuga verde (*Chelonia mydas*) es la más abundante en la zona costera, constituyendo nuestro país, un área de alimentación y desarrollo para esta especie. Esta investigación se enmarca dentro del Proyecto Karumbé, dedicado a la conservación de tortugas marinas trabajando en el Área Marino-Costera Protegida de Cerro Verde e Islas de La Coronilla (Rocha) que es una de las zonas con mayor abundancia de tortuga verde juvenil en Uruguay. *C. mydas* se ve afectada por la actividad agrícola, particularmente en la playa de La Coronilla, en la cual se produce la descarga de agua dulce del Canal Andreoni. Dicho Canal fue construido en la cuenca de la Laguna Merín, con el fin de suministrar agua para el riego del cultivo de arroz y conducir las aguas excedentes de las tierras bajas situadas al sur de la Sierra de San Miguel y de la cuenca de la laguna Negra hacia el océano, en la playa de La Coronilla. En las zonas arroceras se utilizan varios agroquímicos (propanil, quinclorac, clomazone y glifosato) que son arrastrados por el canal hasta la playa de La Coronilla. De todas las afecciones registradas en las distintas campañas de Karumbé, la interacción con desechos antrópicos es uno de los casos más comunes que no solo producen alteraciones macroscópicas, sino que además pueden generar alteraciones genéticas que atentan contra variables como sobrevida y reproducción de esta especie. La presencia de micronúcleos se traduce en el ámbito celular como una pérdida de ADN y la prueba de eritrocitos micronucleados en sangre periférica ofrece resultados claros y definitivos, con la posibilidad de trabajar *in vivo*, y requiere de sólo una gota de sangre. Se realizaron extendidos de sangre periférica por duplicado de 65 individuos en 2 sitios de muestreo, Cerro Verde (zona alejada del canal Andreoni, 5 Km) y Pesquero (zona cercana a la desembocadura del canal Andreoni, 2 Km) y 18 controles negativos utilizando individuos sanos rehabilitados en el Centro de Tortugas Marinas de Karumbé en Montevideo, los cuales fueron destinados al análisis de micronúcleos. Los frotis fueron analizados mediante tinción con yoduro de propidio y análisis en microscopio de epifluorescencia con el software Image Pro Plus™, y revelaron frecuencias altamente significativas de micronúcleos en eritrocitos mononucleados, por cada 2000 glóbulos rojos analizados, lo que estaría reflejando un daño masivo en el ADN en los individuos. Se evaluó el potencial genotóxico de mezcla de productos fitosanitarios y se observó una clara disminución de la cantidad de células con micronúcleos a medida que los sitios de muestreo se alejan del Canal. La información generada será un aporte a los mecanismos que vulneran la sobrevida de *C. mydas* y una primera contribución al monitoreo ambiental de una zona ecológicamente importante, protegida por ley, y altamente impactada por el canal.

Palabras clave: *Chelonia mydas*, genotoxicidad, micronúcleos, ensayo cometa.

INTRODUCCIÓN

El área de estudio corresponde al área protegida costero-marina "Cerro Verde e Islas de la

Figura 1. *Chelonia mydas*

Coronilla". Se encuentra en el departamento de Rocha (33° 56' S; 53° 30' W), y abarca el padrón N° 2643 en el ámbito terrestre y el territorio marino adyacente hasta 5 millas náuticas. Este es el sitio más importante de alimentación y desarrollo de *Chelonia mydas* (Figura 1) en nuestro país ya que presenta gran diversidad de algas marinas, su principal fuente de alimentación (López-Mendilaharsu y cols. 2003). Esta investigación se enmarca dentro del Proyecto Karumbé, dedicado a la conservación de tortugas marinas. Las primeras investigaciones realizadas por Karumbé en la costa de Uruguay permitieron reconocer los principales problemas que afectan a esta especie, como la captura incidental en pesquerías y la contaminación (Caraccio, 2008). A escala global las poblaciones de *C. mydas* se encuentran listadas como; "en peligro de extinción" por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2010 por sus siglas en inglés). Dentro de las amenazas más graves, se encuentran la degradación del hábitat en playas de anidación y en zonas de alimentación y la posible asociación entre la contaminación y el incremento en la prevalencia de tumores (Swimmer, 2000).

Cabe destacar que la importancia de conservar esta especie radica en que estas tortugas marinas constituyen componentes únicos de sistemas ecológicos complejos, en los cuales procesos biológicos como migración y maduración se ven afectados por procesos de degradación ambiental de ambientes costeros y marinos, a escala local, regional y global. Por ello, son especies emblemáticas, tanto para establecer medidas de conservación local como internacional (Frazier, 1999).

En Uruguay, *C. mydas* se ve afectada por la actividad agrícola, particularmente en la playa de La Coronilla, en la cual se produce la descarga de agua dulce del Canal Andreoni (Lercari y Defeo, 1999). Dicho Canal fue construido en la cuenca de la Laguna Merín, con el fin de conducir las aguas excedentes de las tierras bajas situadas al sur de la Sierra de San Miguel y de la cuenca de la laguna Negra hacia el océano, en la playa de La Coronilla, utilizándose también para el suministro de agua con destino al riego del arroz (PROBIDES 1999) que se fertiliza con un producto binario (fósforo y nitrógeno) (Mendez y Anciaux, 1991).

En las zonas arroceras se utilizan varios agroquímicos (propanil, quinclorac, clomazone y glifosato) que por lixiviado y escorrentía terminan en el Canal Andreoni. (PROBIDES, 2001) y a través de él en la playa de la Coronilla. Varios estudios han demostrado el impacto del Canal Andreoni alterando parámetros biológicos (tamaño y espesor de valvas) en *Mesodesma mactroides*, *Donax hanleyanus* y *Emerita brasiliensis* (Defeo y cols. 1986; Defeo y de Alava, 1995; Lercari y Defeo, 1999).

De todas las afecciones registradas en las distintas campañas de Karumbé, la interacción con desechos antrópicos es uno de los casos más comunes que no solo produce alteraciones macroscópicas, sino que además puede generar alteraciones genéticas que atentan contra variables como sobrevivencia y reproducción de esta especie.

Como objetivo general del trabajo se planteó analizar el impacto de contaminantes arrastrados por el Canal Andreoni hacia la playa de La Coronilla, sobre el genoma de *Chelonia mydas*. Como herramienta de monitoreo genético, se utilizó el test de micronúcleos (MN), técnica validada a nivel internacional por la EPA (Environmental Protection Agency) (Ashby, 1988; Carrano y Natarajan, 1988; Wogan, 1992). El test de micronúcleos (MN) en eritrocitos de sangre periférica es un ensayo que permite detectar daño genético a nivel crónico (Figura 2). La presencia de micronúcleos se traduce en el ámbito celular como pérdida de ADN y la prueba de eritrocitos micronucleados en sangre periférica ofrece resultados claros y

Figura 2- Eritrocitos con micronúcleos definitivos, con la posibilidad de trabajar *in vivo* (Mudry, Abrebavaya, micronúcleos 2006). Como objetivos específicos se pretende ajustar el test de micronúcleos (Zúñiga-González, 2001) en *C. mydas*, además de analizar la utilidad de esta especie como organismo centinela, para el biomonitoreo de xenobióticos presentes en la zona.

MATERIALES Y MÉTODOS

El muestreo se realizó en el marco de las actividades del Programa de Monitoreo de la tortuga verde, organizado por Karumbé en el área marino-costera protegida "Cerro Verde e Islas de La Coronilla". Las tortugas fueron capturadas intencionalmente con redes de emalle diseñadas especialmente para tortugas, siendo liberadas vivas luego de la colecta. Las muestras de sangre se colectaron en tubos conteniendo anticoagulante, a través de punción en vena cervical (0.5 ml de sangre periférica por individuo). Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Genética y Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de Facultad de Ciencias. Fueron identificadas con fecha de captura, hora y estado sanitario del animal.

Como control negativo se utilizaron muestras de individuos rehabilitados en las instalaciones de Karumbé en Montevideo.

Se realizaron extendidos de sangre periférica por duplicado de 65 individuos en 2 sitios de muestreo, Cerro Verde (CV) alejado (5 km) de la desembocadura del canal Andreoni, Pesquero zona cercana (2 km) a la desembocadura del canal Andreoni (Figura 3) y 18 controles negativos.

Para el test de MN se contaron 2000 células mononucleadas y se registraron aquellas que presentaron fragmentos de ADN de un tercio del tamaño del núcleo principal (Zúñiga-González, 2001). La cuantificación se realizó en el software Image Pro Plus™ y se calcularon las frecuencias de MN totales y de células mononucleadas con MN. Se sometieron los datos a análisis paramétricos, normalizando los datos usando el software STATISTICA™.

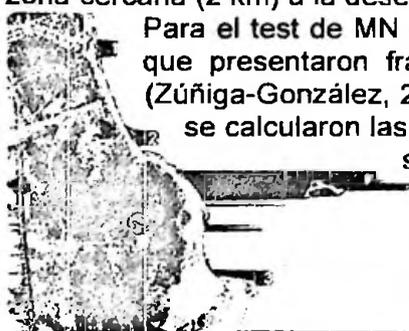


Figura 3. Mapa de zonas de muestreo y Canal Andreoni: 1-Canal Andreoni, 2-Pesquero, 3-Cerro Verde.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se constató una diferencia significativa en el número absoluto de células con MN (gráfico 1) entre las zonas de Pesquero, Cerro Verde y el control negativo. Los resultados se relacionan con la distancia del sitio de muestreo al canal Andreoni.

Como se muestra en el gráfico 2, la cantidad de micronúcleos totales disminuye a medida que los sitios de muestreo se alejan del canal. Pesquero presenta valores muy superiores a los de Cerro Verde y nuevamente se constata un declive al alejarse del canal y respecto al control negativo de animales rehabilitados.

Se evidencia una relación positiva entre ambos resultados (número absoluto de células con MN y número total de MN), disminuyendo el daño genético de los individuos de *C. mydas* al alejarse del canal Andreoni, lo que permite asociar el daño genético a fuentes de contaminación provenientes del mismo, en particular, agrotóxicos. Es amplia la bibliografía que demuestra la acción de los agroquímicos a nivel molecular. Esto genera deterioro celular debido a la producción de macromoléculas dañinas que provocan daño oxidativo y lesiones de doble hebra en el ADN (Ferrari, 2006).

Se analizaron muestras de individuos con tumores observándose un número de eritrocitos con MN significativamente mayor que en ausencia de estos. Se constató la ausencia de tumores en individuos de menores tallas, lo cual coincide con registros en otras áreas de la región (Baptistotte y cols, 2001; Proietti y cols, 2007). Esto refuerza la hipótesis de que el agente causante de dicha afección podría ser adquirido luego del reclutamiento en esta zona costera (Alonso L. *com. per*)



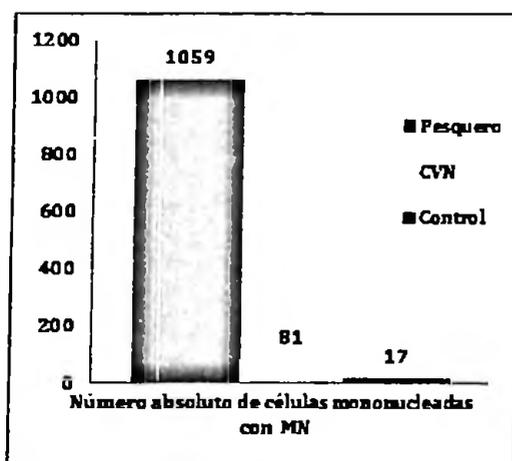


Gráfico 1: Número absoluto de células mononucleadas con MN para cada sitio de muestreo y para el control.

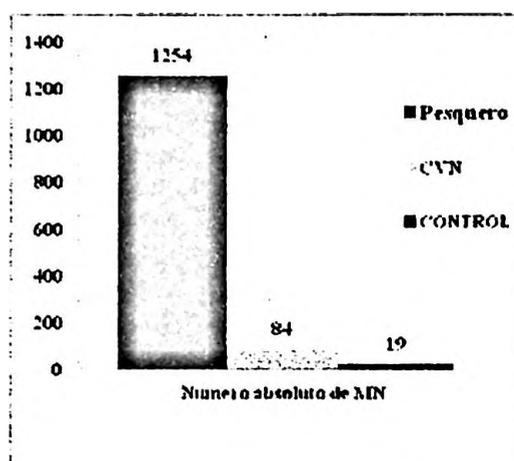


Gráfico 2: Número absoluto de MN para cada sitio de muestreo y para el control.

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Jorge Troccoli por brindarnos el equipamiento del Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido y EDS para realizar los análisis.

A Bruno Techera, Mauro Russomagno, Andrés Estrades y Luciana Alonso por su ayuda en trabajo de campo y colecta de muestras. Permiso Fauna: Resolución 73/08.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, L. *Comunicación personal*.
- Ashby, J. (1988). Comparison of techniques for monitoring human exposure to genotoxic chemicals, *Mutat. Res.* 204: 542-551.
- Baptistotte, C, Scalfone, JT, Gallo, BMG, Santos, AS, Castilhos, JC, Lima, EHSM. (2001). Prevalence of sea turtle fibropapillomatosis in Brazil. In: *Proceedings the 21 Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. Philadelphia: [s.n.]: 24-28.
- Caraccio, 2008. Análisis de la composición genética de *Chelonia mydas* (tortuga verde) en el área de alimentación y desarrollo de Uruguay. Tesis de Maestría, PEDECIBA. Pp. 101.
- Carrano, A.V., Natarajan, A.T., (1988), Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques, *Mutat. Res.*, 204: 379-406.
- Defeo, O, de Alava, A (1995). Effects of human activities on long-term trends in sandy beach populations: the wedge clam *Donax hanleyanus* in Uruguay. *Marine Ecology, Progress Serie.s* 123: 73-82.
- Defeo O, Layerlec C, Masello A (1986) Spatial and temporal structure of the yellow clam *Mesodesma mactroides* (Deshayes, 1854) in Uruguay. *Medio Ambiente.* 8(1): 48-57.
- Ferrari, L (2006). Ecotoxicología. En: *Genética Toxicológica*. Mudry M y Carballo M (Eds). Pp.669
- Frazier, J (1999). Community Based Conservation. Research and management techniques for conservation of sea turtle. En: Eckert Bjornald Abreu-Grobois & Donnelly (Eds). *IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication* (4): 15-18.
- Lercari D, Defeo O (1999). Effects of freshwater discharge in sandy beach populations: the mole crab *Emerita brasiliensis* in Uruguay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* 49: 457-46
- López- Mendillaharsu M, Estrades A, Fallabrino A, Brazeiro A. *Incorporación del área costero marina "Cerro verde" al sistema nacional de áreas protegidas (Informe técnico)*.
- Mendez S, Anciaux F (1991). Efectos en las características del agua costera provocados por la descarga del canal Andreoni en la Playa de la Coronilla (Rocha Uruguay). *Frente marítimo.* (8) Sec. A: 101-107.
- Mudry MD, Abrebavaya X.C (2006). Aneugenicidad y Clastogenicidad. En: *Genética Toxicológica*. Mudry M y Carballo M (Eds). Pp.669

- PROBIDES (1999). Plan Director Reserva de Biosfera Bañados del Este, Uruguay. *Probides. Mosca Hnos. Montevideo*. Pp. 159.
- PROBIDES (2001). Calidad del agua en el departamento de Rocha. *Serie: Documento de Trabajo-N°39*.
- Proietti Carneiro M, Lara-Ruiz P, Wiener Reisser J, da Silva Pinto L, Antonio Dellagostin O, Fernando L. (2007). Green turtles (*Chelonia mydas*) foraging at Arvoredo Island in Southern Brazil: Genetic characterization and mixed stock analysis through mtDNA control region haplotypes. *Marine Genetics and Molecular Biology*. 32(3): 613-618.
- Swimmer J (2000). Biochemical responses to fibropapilloma and captivity in the green turtle. *Journal of Wildlife Diseases*. 36 (1):102-110.
- Wogan GN (1992). Molecular epidemiology in cancer risk assessment and prevention: Recent progress and avenues for future research. *Environ. Health Perspect.* 98: 167-178.
- Zuñiga-González G (2001). Variation of micronucleated erythrocytes in peripheral blood of *Sciurus aureogaster* in relation to the age. *Env. And Mol. Mutag.* 37: 173-177

ENSAYO DE UTILIZACIÓN DE HOMEOPATÍA EN EL CONTROL DE ECTOPARÁSITOS DEL GOLDFISH (*Carassius auratus*).

Carnevia, D. y Cundlles, N.

Área Acuicultura y Patología de Organismos Acuáticos, Instituto de Investigaciones Pesqueras, Facultad de Veterinaria, UDELAR, Uruguay.
dcamevia@gmail.com

Las ectoparasitosis son las afecciones más comunes tanto en los criaderos como en los comercios de peces ornamentales. Trabajos anteriores determinaron que los monogénicos y los protozoarios son los ectoparásitos principales, los que suelen producir infestaciones mixtas cuando los peces se debilitan. Como las principales sustancias empleadas en el control y tratamiento de estas ectoparasitosis tienen algunos efectos adversos en los peces, es importante encontrar alternativas de control menos agresivas. El presente trabajo tiene como objetivo probar la utilización de la homeopatía como tratamiento para control de ectoparásitos en peces ornamentales. Se empleó una población de alevinos de goldfish (*Carassius auratus*) afectada por una infestación múltiple de *Gyrodactylus* sp. (Trematoda, Monogenea), *Piscinoodinium* sp. (Dinoflagellida, Oodinaciae), *Ichthyobodo necator* (Euglenozoa, Ichthyobodonidae) y *Trichodina* sp. (Ciliophora, Trichodinidae). Se realizó un examen inicial mediante frotis de piel observado en fresco al microscopio, a una muestra de 20 peces para calcular en base a estos números la prevalencia antes del tratamiento. Se numeró según una escala de cuatro números la abundancia de ectoparásitos en aquellos peces positivos: 1 = baja abundancia; 2 = media abundancia y 3 = alta abundancia calculándose luego un promedio de abundancia, el que se muestra en la tabla 1. Los peces se dividieron luego en 4 lotes de 50 individuos colocados en acuarios de 20 litros con filtro y salida de aire. Dos lotes se dejaron como control y dos lotes se trataron con un preparado homeopático (calcareo carbonica 6°) a razón de 20 glóbulos por acuario cada 3 días. Los peces se alimentaron con ración balanceada 35 % PB y se realizaron cambios de un tercio del agua cada tres días previo a la aplicación del preparado homeopático. Se llevó registro diario de la temperatura y de los peces muertos. A los 21 días se procedió a realizar un muestreo al azar de cada acuario, sacando 10 peces a los que se practicó examen de ectoparásitos. Los resultados se muestran en la tabla 1.