

Determinación en peces de biomarcadores histológicos y genéticos de contaminación ambiental

M. E. Palma Leotta¹; D. Ibaceta¹; N. Gorla²

“Recursos Humanos en Formación: A. Cáceres; M. Caliri; E. Saldeña.

¹UPV.UMAZA. (Unidad de Prácticas Veterinarias-UMAZA)

²CONICET, UNRC, UMAZA.

maepalma00@yahoo.com.ar

Resumen

Con el fin de conocer el estado ecosanitario de un ambiente acuático se busca determinar alteraciones y efectos producidos por contaminantes plaguicidas. Esto se realizará a través de la evaluación de biomarcadores histológicos, toxicológicos y genéticos en percas criollas del Embalse El Nihuil, Mendoza.

Se realizará la captura in situ de una muestra poblacional de *Percichthys trucha*, evaluación sanitaria de cada ejemplar y toma de muestra para estudios de laboratorio. Se determinará la presencia y graduación de alteraciones histopatológicas en branquias, hígado y riñón (Bernet, 1990). Se determinará el nivel de daño genético según el testeo de micronúcleos (Schmid 1975). Se determinará la presencia/ ausencia de plaguicidas por espectrofotometría en tejido de peces y agua. Se determinará la correlación estadística entre nivel de tóxico y aparición de lesiones a nivel tisular, celular y cromosómico. Se espera validar el uso de biomarcadores histológicos y genéticos en peces para evidenciar contaminación acuática nociva.

La información generada servirá para conocer más sobre las especies autóctonas y su estado de salud en función de la calidad del agua del ambiente en que viven. También posibilitará un seguimiento en el tiempo de la salud general y genética de la población con proyección a salud del ambiente acuático en estudio. Los resultados obtenidos serán de utilidad para la comunidad, el gobierno y las empresas relacionadas.

Se busca establecer marcos de referencia para la especie estudiada que contribuyan a programas de conservación, evaluación de riesgo ambiental y monitoreo sobre el recurso hídrico con la potencial aplicabilidad sobre diferentes ecosistemas acuáticos.

Introducción

La conservación del agua en el planeta es un gran desafío en nuestro tiempo. Mendoza es un desierto en permanente crisis hídrica y el agua proveniente del deshielo de nuestras montañas es un valioso recurso que se ha sabido almacenar, distribuir y utilizar con eficacia. Sin embargo no somos ajenos al problema de la contaminación. Ante la observación de recurrentes eventos de mortandad de peces en algunos am-

bientes acuáticos de Mendoza, buscamos desarrollar una herramienta eficaz que permita correlacionar el estado sanitario de una población en función de la calidad del agua del ambiente en que se encuentra.

La evaluación de riesgo ecológico se basa en la caracterización y estimación de la probabilidad que hayan ocurrido, estén ocurriendo o vayan a ocurrir efectos adversos en sistemas ecológicos debido a actividades humanas. Con ello puede establecerse si el grado de contaminación presente en un sitio genera efectos nocivos; cuanto mayor sea el riesgo de que la contaminación afecte a los seres vivos, mayor será la necesidad de instrumentar programas de restauración.^(12, 13) Los peces son particularmente blanco de la contaminación, éstos al ingerir sustancias contaminadas desarrollan posteriormente alteraciones debidas a la bioacumulación de los contaminantes ambientales en sus órganos. Por tal motivo son utilizados como organismos modelo como centinelas para la evaluación de contaminación en ecosistemas acuáticos⁽⁷⁾.

El uso de biomarcadores histológicos y genéticos en peces para vigilar la polución en ecosistemas es reconocido para metales pesados^(1, 5), plaguicidas^(2, 9) y otros contaminantes. Muestran el efecto de cambios bioquímicos, moleculares y celulares en el organismo y son indicadores presentes de efectos biológicos a futuro⁽⁶⁾ Se propone el uso de los mismos como una herramienta sensible de alarma temprana para medidas en la evaluación de la calidad ambiental.

En la Argentina, dentro de los agroquímicos, los herbicidas son los que poseen mayor volumen de venta, ocupando el segundo lugar los insecticidas⁽¹⁰⁾. De estos últimos, en primer lugar estarían los organofosforados (OF), luego los piretroides, órganoclorados (OC), carbamatos y otros. El potencial genotóxico de los plaguicidas ha sido bastante estudiado y hay considerables evidencias que demuestran su capacidad de inducir daño cromosómico, intercambio de cromátidas hermanas y mutación puntual.⁽⁸⁾ La prueba de detección de micronúcleos es una de las técnicas más confiables para determinar cambios genéticos en los

organismos y con resultados sensibles para el monitoreo de contaminación acuática.⁽³⁾

La UMAZA, en colaboración con la Dirección de Recursos Naturales Renovables (DRNR) y empresas relacionadas buscan por medio de este proyecto desarrollar un método de evaluación de riesgo ambiental in situ basada en biomarcadores y aportar al conocimiento ecosanitario de este ambiente.

Materiales y método

Área de muestreo: Embalse El Nihuil. Provincia de Mendoza, Argentina. 35°04'S, 68°45'O; 1325 msnm. Es el lago artificial más grande de nuestra provincia (9600 has), ubicado sobre el río Atuel, al sur de Mendoza. Se utiliza para abastecimiento humano, generación de energía eléctrica, regadío y turismo. En el mismo se practica la pesca y los deportes acuáticos de todo tipo. El departamento tiene el 34% de la superficie cultivada con frutales, donde se utilizan plaguicidas. Sucesivos fenómenos de mortandad masiva de peces se han sucedido en este embalse. El primer antecedente se registra en 2005 cuando murieron más de 30000 ejemplares afectados por parásitos, bacterias y hongos. El fenómeno se repitió en 2005 y 2009 y los monitoreos arrojaron la presencia del parásito *Lernaea* (Copepoda : *Lernaeidae*) en el embalse. A finales del 2010 también se produjo este fenómeno y se asoció a la falta de alimento producida por una gran masa de macrófitas, con la consiguiente depresión de las defensas y aparición de enfermedad en los peces. En agosto del 2011 se produjo una mortandad masiva de aves y peces en la región. Las autoridades oficiales le adjudicaron una causa antrópica (una explosión o derrame de hidrocarburos).

Unidad de análisis: Perca Criolla (*Percichthys trucha*), especie nativa y más abundante del sitio y en eventos de mortandad masiva anteriormente registrados ha sido la especie con mayor número de ejemplares muertos.

Tipo de estudio: descriptivo, observacional y transversal. Se realizará un muestreo por conveniencia mediante la captura por redes. Se calcula el n muestral sobre los datos de población ictícola determinado por ecosondas: n= 50 ejemplares. Se captura la muestra con redes específicas que seleccionan animales por tamaño. Se ubican territorialmente los cardúmenes de percas (por ecosondas y testimonios de pescadores) para realizar el calado de las redes y lograr la selección de especies. El primer muestreo será en primavera, posterior a la temporada de fumigaciones. Se registrarán las condiciones y variables ambientales al momento del muestreo: Temperatura ambiente, temperatura del agua, profundidad de la zona de muestreo, oxígeno disuelto y pH del agua. Una vez capturado el pez vivo se realizará una rápida eutanasia por desmedulación cervical (corte con tijera en caudal de los opérculos) y se procederá inmediatamente a: toma de muestra de sangre de la Vena Dorsal para estudios citogenéticos, realización de mediciones corporales, pesaje, muestreo lepidológico de escamas. Se tomarán pequeñas muestras de músculo para estudios toxicológicos. Se aplicará una técnica de necropsia rigurosa, realizando la evaluación anatómica y macroscópica de alteraciones orgánicas y la toma

de muestra para estudios histopatológicos de los órganos (branquias, hígado, riñón). Estas muestras se remitirán al laboratorio en formaldehído 4 % para su posterior procesamiento mediante técnicas histológicas estándares para su inclusión en parafina, tinción con Hematoxilina Eosina, PAS u otras y observación al microscopio óptico para su evaluación final. Descripción de las alteraciones estructurales observadas en órganos y medición de la extensión de cambio patológico con una "escala de valores" y la importancia patológica de la alteración con un "Factor de Importancia", según el protocolo de evaluación de contaminación ambiental propuesto por Bernet y col. Análisis morfométrico de branquia mediante procesamiento digital de imágenes para medir las alteraciones y generar valores de referencia. Las muestras de músculo serán enviadas congeladas para la detección de plaguicidas (OF, OC, Piretroides, endosulfán) por espectrofotometría gaseosa. Las muestras para citogenética serán enviadas refrigeradas al laboratorio y procesadas para obtención de cariotipo y medición de micronúcleos en frotis de sangre periférica.

Resultados Esperados

Medir la extensión de los cambios histopatológicos y la importancia de las alteraciones, para generar un registro de datos referenciales y que puedan ser analizados estadísticamente (según el protocolo de evaluación de contaminación ambiental propuesto por Bernet y col, 1999). Con esto se determina el índice de daño que sufre un órgano y permite la comparación del estado de ese órgano entre diferentes individuos. También se pueden obtener índices que midan el estado general de salud del pez, basado en lesiones histopatológicas, mediante la sumatoria de índices de diferentes órganos en un mismo animal, permitiendo comparaciones entre individuos. Se espera determinar los biomarcadores de exposición (medición de tóxicos) y de efecto (histológicos y genéticos) en la especie silvestre estudiada y sus correlaciones. Determinar la prevalencia de exposición (proporción de individuos expuestos que poseen un biomarcador alterado en relación al total de individuos estudiados). El testeo de micronúcleos en branquias de percas determinará valores de referencias que permiten comparaciones estadísticas con muestreos repetidos o en otros sitios. Avalar los resultados obtenidos para utilizarlos en comparaciones con estudios en otros sitios de mayor o menor impacto antropogénico. Determinar la necesidad de comparación con bioensayos experimentales ya realizados o para ejecutar, con el fin de homologar resultados con los encontrados a campo, relacionar diferentes tóxicos con la aparición de diferentes alteraciones y establecer una relación causa – efecto y generar un registro de antecedentes. Formación de Recurso Humano. Divulgación científica de la información.

Bibliografía:

- Abdallah, A.T.** (2000). On the efficiency of some histological techniques as biomarker for heavy metal pollution. *Science, Technology and Education of Microscopy: An Overview*. 287-296
- Aiassa D, Gorla N, Bosch B.** (2011) Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. *Journal of Toxicology & Environm. Sciences* Vol. 3(5), pp. 155–163
- Arslan, Parlak, Katalai.** (2010) Detecting micronuclei frequency in some aquatic organisms for monitoring pollution of Izmir Bay (Western Turkey). *Environ Monit Assess.* 165: 55 – 66
- Bernet, D., Schmidt H, W. Meier, P. Burkhardt-Holm, T. Wahli.** (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases.* 22: 25-34
- Domitrovich HA.** Toxicidad y respuesta histopatológica en *Cichlasoma dimerus* (Pisces, Cichlidae) expuestos a cipermetrina en ensayos de toxicidad aguda. *UNNE Comunicaciones Científicas y Tecnológicas* 2000
- Marigomez, I., M. Soto, I. Cancio, A. Orbea.** (2006). Cell and tissue biomarkers in mussel, and histopathology in hake and anchovy from Bay of Biscay after the Prestige oil spill (Monitoring Campaign 2003). *Marine Pollution Bulletin.* 53: 287-304
- Mitchell, S. & Kennedy, S.** 1992. Tissue concentrations of organochlorine compounds in common seals from the coast of Northern Ireland. *Science of the Total Environment* 115: 235-240.
- Peitl Jr., P., Sakamoto-Hojo, E.T.** 1996. Genotoxic activity of the insecticide Nuvacron (Monocrotophos) detected by the micronucleus test in bone marrow erythrocytes of mice and in CHO cells. *Revista Brasileira de Genética* 19 (4): 571-576.
- Ramírez W, Rondón L, Vidal H.** Toxicidad aguda y lesiones histopatológicas en cachama blanca (*Piaractus brachipomus*) expuestas a la mezcla de herbicida roundup® más surfactante cosmoflux® 411. *Rev. MVZ Córdoba* 14(1):1563-1575, 2009
- Rodríguez, E.M.** 1991. Efectos letales y subletales de dos plaguicidas sobre las especies *Uca uruguayensis* y *Chasmagnathus granulata* (Cangrejal Bonaerense). *Fac. Cs. Exactas y Nat. (UBA). Tesis de Doctorado:* 219 pp.
- Schmid, W.** 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31: 9-15
- Suter G.** (1995) *Ecological risk assessment.* Lewis Publishers. London. Reino Unido. 538 pp
- USEPA** (1998) *Guidelines for ecological risk assessment.* Risk assessment forum U. S. Environmental Protection Agency. EPA/630/ R-95/002F. Washington. EE.UU. 171 pp.