

PUESTA A PUNTO Y DETERMINACION DE VALORES BASALES DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS E INDICE MITOTICO EN LINFOCITOS DE CAIMAN LATIROSTRIS (YACARÉ OVERO), COMO MARCADORES DE GENO Y CITOTOXICIDAD.

Camila Felisa Chacón¹

¹Proyecto Yacaré- Lab. Zoología Aplicada: Anexo Vertebrados (FHUC-UNL/MMA), Av. Aristóbulo del Valle 8700 (3000) Santa Fe, Argentina.

Directora: Poletta, Gisela Laura.

Codirectora: López González, Evelyn Cecilia.

Área: Ciencias Naturales.

INTRODUCCIÓN

Las especies de cocodrilidos están escasamente estudiadas con respecto a la estructura cromosómica, que es esencial para la conservación de la integridad genética de las poblaciones nativas (López González et al., 2015). *C. latirostris* es una de las dos especies de cocodrilianos que habitan en Argentina (Larriera et al., 2008). En nuestro país, como consecuencia de la expansión de las fronteras agrícolas en los últimos años, muchas áreas de la distribución geográfica de esta especie han quedado superpuestas con regiones de intensa actividad agrícola. Diferentes ensayos a corto plazo (ECP), conocidos como biomarcadores de genotoxicidad, se utilizan para evaluar el daño cromosómico y a la molécula de ADN, inducido por agentes físicos y/o químicos. En *C. latirostris* hasta el momento, se han utilizado el test de micronúcleos y el ensayo cometa debido a su sensibilidad y facilidad de aplicación (Poletta et al., 2008, 2009; 2011; López González et al., 2013; 2017).

El test de aberraciones cromosómicas (AC) y el índice mitótico (IM) son ECP que permiten la detección temprana de los efectos producidos por agentes que causan daño cromosómico y / o alteraciones en la cinética celular, proporcionando conjuntamente gran información sobre sus mecanismos de acción.

Hasta el momento, se habían realizado avances en las condiciones óptimas para el cultivo de linfocitos de sangre periférica (LSP) para el análisis de metafases de buena calidad (López González et al., 2015), pero la técnica de AC e IM no se habían aplicado en esta especie ni en ninguna otra especie de cocodriliano.

Título del proyecto: Marcadores biológicos de alerta temprana aplicados al estudio de poblaciones silvestres de reptiles de interés regional sometidas a estrés ambiental.

Instrumento: PIP-GI

Año convocatoria: 2014-2016

Organismo financiador: CONICET

Director/a: Gisella L. Poletta

OBJETIVOS

- Poner a punto la determinación de Aberraciones Cromosómicas (AC) e Índice Mitótico (IM) en LSP de *C. latirostris*.
- Determinar los valores basales de AC e IM en la especie y caracterizar los tipos de AC más frecuentes de acuerdo a los antecedentes bibliográficos.
- Determinar la sensibilidad de estas técnicas como marcadores de genotoxicidad y citotoxicidad en *C. latirostris*, en respuesta a la exposición *in vitro* a un agente genotóxico y citotóxico conocido como el MMS.

METODOLOGIA

Se llevó a cabo un ensayo de exposición *in vitro* de sangre entera al conocido agente genotóxico Metil-metanosulfonato (MMS) a 10 y 20 μM , y un control negativo (CN) sin la exposición a dicho agente. Todos los tratamientos se realizaron por duplicado. Para la evaluación de AC, se analizaron metafases correspondientes a ambas replicas.

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena espinal (Myburgh et al., 2014) de tres juveniles de *C. latirostris* pertenecientes al Proyecto Yacaré (MUPCN / MMA, Santa Fe), con jeringas heparinizadas. Siguiendo el método propuesto por Amavet et al. (2003) para el análisis del cariotipo en *C. latirostris* ($2n = 42$) y las modificaciones introducidas por López González et al. (2015), se realizaron cultivos celulares para obtener metafases de calidad y cantidad necesarias para el análisis AC e IM. Brevemente, se usó RPMI 1640 como medio de cultivo suplementado con 20% de suero bovino fetal, antibióticos para evitar la contaminación del cultivo, fitohemaglutinina como agente mitógeno de linfocitos y colchicina para la detención de la división celular en metafase. Los cultivos se incubaron a 29-30 ° C durante 72 hs. Después de la cosecha, se realizaron goteos sobre portaobjetos a 50 ° C. Se tiñeron con una solución 1:10 de Giemsa en agua estabilizada (pH = 6,8) durante 10 minutos.

Índice mitótico (IM): se calculó a partir del análisis de 1000 linfocitos estimulados por muestra y se expresó como porcentaje, de la siguiente manera (**Fla 1**):

Fla 1: %IM: (Número de metafases / Número total de linfocitos estimulados) \times 100

Frecuencia de Aberraciones cromosómicas (AC): se analizaron en 100 metafases (50 de cada réplica) y se clasificaron como monosomía, nulisomía (Aberraciones numéricas); fragmento tipo cromátide, dobles diminutos, cromosomas sin centrómero, gaps y cromosomas dicéntricos (Aberraciones estructurales) (**Fla 2**).

Fla 2: Incidencia de metafases aberrantes (%): (Número total de metafases aberrantes / Cantidad total de metafases contadas) \times 100

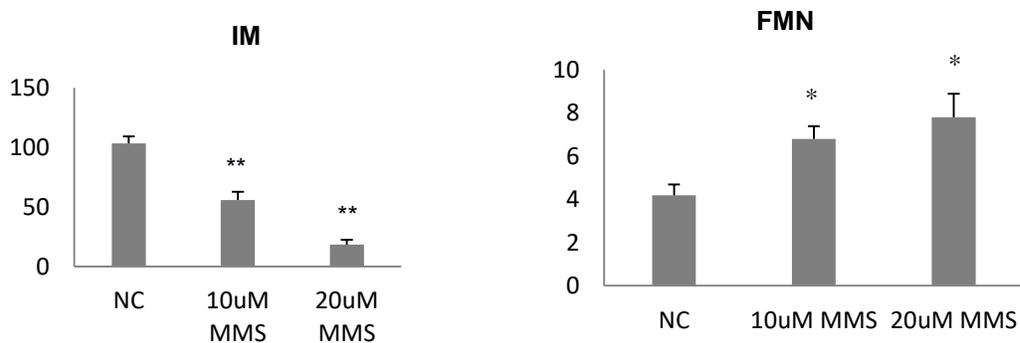
Teniendo en cuenta la sensibilidad previamente demostrada para el test de MN como marcador de clastogénesis/aneugénesis en esta especie, se incorporó también la determinación de Frecuencia de micronúcleos (FMN), con el objeto de aumentar la caracterización de los efectos del MMS y tomarla como referencia para comparar la respuesta obtenida con los nuevos biomarcadores propuestos (**Fla 3**).

Fla 3: %FMN: Número de células con MN / 1000 eritrocitos contados

Las muestras se observaron con un microscopio (Nikon Eclipse E200, 1000x), y las imágenes se registraron con el programa Paint 3D para análisis de Windows a CA.

RESULTADOS

Los resultados indicaron diferencias significativas en el IM ($p < 0,01$; Kruskal-Wallis / MannWhitney) y en la FMN ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis / Mann-Whitney) en los grupos expuestos a ambas concentraciones de MMS, respecto del CN (**Fig. 1**).



a)

b)

Fig. 1. a) Índice mitótico (IM: N metafases / 1000 linfocitos%) y b) Frecuencia de micronúcleos (FMN: células MN / 1000 eritrocitos) en *C. latirostris* observada en los diferentes tratamientos. * Diferencias significativas en comparación con CN ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente).

En la **Tabla 1** se indican los tipos de AC observadas luego de la exposición a las dos concentraciones de MMS y sus diferencias respecto del CN. Como puede observarse, la concentración más alta de MMS indujo mayor número y tipos de AC, pero en ambas concentraciones se observaron diferencias significativas respecto al CN para al menos dos tipos diferentes de aberraciones.

Tabla 1: Tipos y frecuencias de aberraciones cromosómicas (AC) observadas luego de la exposición *in vitro* a 10 20 μ M de MMS y un Control Negativo en linfocitos de *C. latirostris*.

Tratamiento	%AC	Aberraciones Numéricas		Aberraciones Estructurales				Otros
		Mns	Nls	Frac.	Gap	DD	Dicéntri.	
Control	1,06±0,19634	3	3	84	0	10	1	7
10 μ M MMS	4,07±0,4856**	4	8	351**	2	40**	0	5
20 μ M MMS	4,7±0,51316**	12*	16**	242**	21**	42**	7*	14

Monosomías (**Mns.**); Nulisomías (**Nls.**); Fractura cromátide (**Frac.**); **Gap**; Doble diminutos (**DD**); Dicéntricos (**Dicentri.**) Cromosomas sin centrómeros (**S/centr.**). *Diferencias significativas en comparación con CN; **Diferencias altamente significativas respecto al CN en la incidencia de células aberrantes (%AC).

CONCIDERACIONES FINALES

Este estudio proporciona el primer reporte sobre la aplicación de la técnica AC en *C. latirostris* y en todas las especies de cocodrilos, así como el tipo de AC inducidas por un agente genotóxico conocido, el MMS. Además, permite la incorporación de esta técnica como un nuevo biomarcador de genotoxicidad para ser incluido en la batería de pruebas aplicadas rutinariamente para la evaluación del efecto genotóxico producido por diferentes agentes en esta y otras especies nativas de reptiles.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Amavet P., Markariani R., Fenocchio A., 2003. Comparative cytogenetic analysis of the South American alligators *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Reptilia, Alligatoridae) from Argentina. *Caryologia* 56(4) 489-493.

Larriera A, Imhof A, Siroski P., 2008. Estado actual de los programas de conservación y manejo del género *Caiman* en Argentina. In: Castroviejo, J., Ayarzagüena, J., Velasco, A. (Eds.), *Contribución al conocimiento del Genero Caiman de Suramerica*, Public. Asoc. Amigos de Doña Ana 18, Sevilla, España, pp 139-179.

López González EC., Latorre MA., Larriera A., Siroski PA., Poletta G.L., 2013. Induction of micronuclei in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*) hatchlings exposed in vivo to Roundup® (glyphosate) concentrations used in agriculture. *Pestic Biochem Physiol.* 105: 131-134

López González EC., Andrioli N., Siroski PA., Poletta GL., 2015. STANDARDIZATION OF *Caiman latirostris* LYMPHOCYTE CULTURE FOR THE APPLICATION OF CHROMOSOMAL ABERRATION TEST. SETAC Latin America 11th Biennial Meeting. Buenos Aires, Argentina.

López González EC, Larriera A, Siroski PA, Poletta GL., 2017. Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) hatchlings after embryonic exposure to different pesticide formulations. *Ecotoxicol Environm Saf.* 136: 84-91.

Myburgh J.G, Kirberger RM, Steyl JCA, Soley JT, Booyse DG, Huchzermeyer FW, Lowers RH, Guillette LJ., 2014. The postoccipital spinal venous sinus of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*): Its anatomy and use for blood sample collection and intravenous infusions. *J S Afr Vet Assoc* 85: (1) 1-10.

Poletta, G.L., Larriera A., Kleinsorge E., Mudry M.D., 2008. *Caiman latirostris* (broadsnouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: basal values determination of micronucleus and comet assay, *Mutat. Res.* 650: 202–209.

Poletta, G.L.; A. Larriera; E. Kleinsorge; M.D. Mudry., 2009: Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutat. Res.* 672 95–102.

Poletta, GL., Kleinsorge E., Paonessa A., Mudry MD., Larriera A., Siroski PA., 2011. Genetic enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed in ovo to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74: 852-859.