

**XIX ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES DE LA UNL**

**TOXICIDAD GENÉTICA Y HEPÁTICA PROVOCADA POR CULTIVOS DE ARROZ  
EN ANFIBIOS ANUROS ADULTOS.**

**Iván, Huespe**

*Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Ciencias Médicas. Ruta Nacional Nº 168 - Km 472,4 – Santa Fe Capital (CP: 3000)*

**Área temática:** Ciencias Biológicas

**Sub-área:** Biología

**Grupo:** X

**INTRODUCCIÓN**

Los ecosistemas agrícolas son sistemas transformados por el hombre con fines productivos y en la actualidad cubren cerca del 40% de la superficie libre de hielo del planeta (Sans, 2007). En ellos se generan impactos nocivos sobre la fauna silvestres (Fenoglio et al., 2005; Poletta, 2011). En este sentido, toma particular importancia la utilización de especies indicadoras y biomarcadores de toxicidad ambiental. Los anfibios son buenos organismos indicadores de contaminación ya que presentan permeabilidad de su piel, restringida área de acción y un ciclo de vida bifásico (agua-tierra), que los hace vulnerables a perturbaciones acuáticas y terrestres (U.S.EPA, 2002).

El hígado de los anfibios presenta melanomacrófagos (MM), derivados de las células de Kupffer que contienen melanina. Estas células fagocitan material extraño y eliminan radicales libres produciendo melanina (Fenoglio et al., 2005). La medición cuantitativa de melanina a nivel hepático podría constituir una herramienta para programas de monitoreo biológico, ya que un aumento en el número y área ocupada por los MM, indicaría tempranamente los efectos adversos producidos por la alteración del hábitat y/o presencia de contaminantes. Por otra parte, la existencia de núcleo y la capacidad de los eritrocitos de anuros para dividirse permiten evaluar la presencia de micronúcleos. Estos son masas de cromatina con forma de pequeños núcleos que se originan de manera espontánea o como respuesta a la acción de determinados xenobióticos (AISabti y Metcalfe, 1995). El ensayo de micronúcleos en eritrocitos se utiliza en varias especies de peces, reptiles y anfibios para monitorear contaminantes ambientales que presentan potencial genotóxico (Udroiu, 2006; Marquez et al., 2009; Poletta, 2011).

**OBJETIVOS**

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, se recolectaron individuos adultos de la rana criolla chaqueña *Leptodactylus chaqueensis* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), en dos áreas diferentes: de un sitio de referencia (SR) y de cultivos de arroz (CA), con la finalidad de:

- Describir la estructura histológica hepática y las posibles alteraciones morfológicas que pudieran presentarse en animales provenientes de CA.
- Evaluar cambios en la actividad de enzimas de estrés oxidativo en individuos de CA.
- Valorar la genotoxicidad inducida por la exposición a agroquímicos en cultivos de arroz a través de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

**Área de estudio:** La región se encuentra incluida en el principal núcleo agro-productivo de Argentina y coincide con una de las áreas de mayor diversidad de anfibios del país. El sitio de referencia (SR) se localiza a orillas del río Paraná (31°10'21.10"S; 60°15'31.73"W), y el cultivo de arroz (CA) en el departamento San Javier (CA), provincia

**Becas de estímulo a las vocaciones científicas del Consejo Interuniversitario Nacional (EVC-CIN 2014).**

**Director:** Cabagna Zenklusen, Mariana; Codirector: Peltzer, Paola Mariela

**Colaboradores:** Lajmanovich, Rafael Carlos; Attademo, Andrés Maximiliano; Junges, Celina; Villafañe, Noelia.

de Santa Fe (30°05'13.56"S; 59°53' 19.98"W). El cual fue fumigado 24 horas antes de la captura con un agroquímico comercial que contiene clorpirifos al 48% (Terminator, AGROS soluciones, Argentina) el cual fue aplicado con avión en proporciones de 800 ml/hectárea.

**Selección de especies:** *L. chaquensis* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), rana criolla chaqueña, es una especie de amplia distribución en Argentina, y se localiza frecuentemente en sitios naturales, en cultivos y áreas suburbanas.

**Captura y procesamiento de las muestras:** Se capturaron a mano 18 adultos de *L. chaquensis*, 9 en el sitio de referencia y 9 en el cultivo de arroz y fueron transportados al laboratorio. Los animales fueron sacrificados según protocolo de la ASIH et al., 2004 y se les extrajo un lóbulo del hígado y sangre mediante punción cardiaca.

**Procesamiento de las muestras hepáticas:** Los fragmentos tisulares fueron fijados en formol 10%, deshidratados e incluidos en parafina. Se realizaron cortes seriados de cada muestra con un grosor de 5 µm (t = 0,005 mm). Luego se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE) para evaluar la morfología, alteraciones hepatocíticas y la distribución de los melanomacrófagos (MM). Para la determinación de parámetros morfométricos de los MM (área total y cantidad) se tomaron microfotografías con el objetivo de 20x, en 30 campos microscópicos al azar, con una cámara Motic Cam 10MP acoplada a un microscopio de luz Arcano L1200B. Se utilizó el software Image J para calcular la cantidad, área y la superficie total ocupada por MM.

**Procesamiento de las muestras sanguíneas:** Inmediatamente después de la extracción se realizaron extendidos sanguíneos. Una vez secos se colorearon mediante May Grunwald-Giemsa. Se eligieron campos microscópicos al azar y utilizando objetivo de inmersión se contó la cantidad de micronúcleos cada 1000 eritrocitos (Marques et al., 2009).

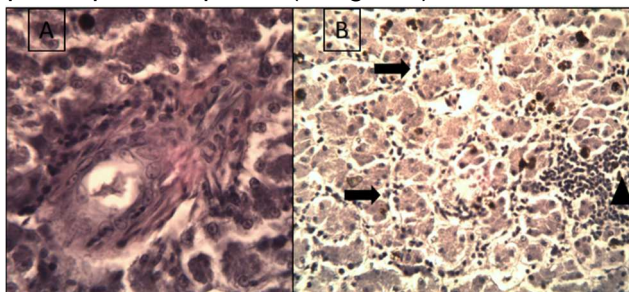
**Actividad de las enzimas de estrés oxidativo:** Los fragmentos hepáticos se homogeneizaron (con hielo) en 0.1% de polietilén glicol octofenil éter (triton X-100) en 25 mM tris (hidroximetil) amino metano hidrociorado (pH= 8,0). Los homogeneizados se centrifugaron a 10000 rpm por 15 min a 4 °C, y se recogieron los sobrenadantes. La actividad de la Glutación-S-transferasa (GST) fue determinada con los métodos descritos por Habig et al., (1974) y la actividad de la Catalasa (CAT) con el método descrito por Aebi (1984).

**Evaluación estadística:** Se confeccionó una base de datos a partir de los resultados morfométricos para permitir su tratamiento con el software estadístico. Los resultados se expresaron como valor medio ± error estándar (ES). Para evaluar las diferencias de las variables entre RF y CA se realizó, con los parámetros que cumplían con los supuestos de normalidad (Prueba de Kolmogorov-Smirnov), la prueba paramétrica de t-student y para los que no los cumplían, se realizó el test de Mann-Whitney. Una probabilidad inferior a 5% (p<0,05) se consideró como estadísticamente significativa. Los cálculos se efectuaron con el software estadístico InStat Version 3.01.

## RESULTADOS

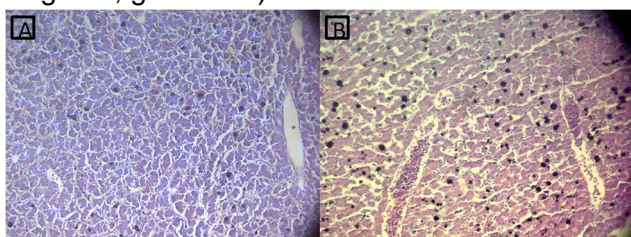
**Organización del tejido hepático:** En los cortes histológicos coloreados con HE de hígados de *L. chaquensis* de SR se observó que el parénquima está organizado en láminas de hepatocitos poliédricos, mononucleados, bien delimitados, con núcleos eucromáticos y citoplasma granular eosinófilo, separados por capilares sinusoidales con eritrocitos en su interior. Se observaron múltiples estructuras vasculares rodeadas por una capa continua de endotelio acompañadas de canalículos biliares. También se observaron vasos con paredes discontinuas sin componentes biliares, semejantes a las venas centrales descriptas en mamíferos.

**Infiltrado mononuclear hepático:** En los hígados de *L. chaquensis* tanto de SR como de CA se observó infiltrado mononuclear perivascular y difuso. Sin embargo en los individuos de CA se observó aumento del infiltrado tanto perivascular como en forma difusa y focal en el parénquima hepático (Imagen 1).

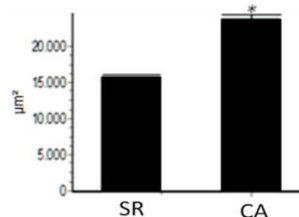


**Imagen 1:** Hígado de rana proveniente de CA, HE 40x. A: Infiltrado mononuclear perivascular. B: Infiltrado mononuclear focal (triángulo) y difuso por el parénquima hepático (flechas).

**Área y cantidad de MM hepáticos:** En los cortes histológicos de los hígados de *L. chaquensis* provenientes SR, los MM presentaron una distribución aleatoria en el parénquima hepático, algunos pocos, rodeados por escaso infiltrado mononuclear. Se contabilizaron  $92 \pm 1,62$  MM por campo de 20x. Estos ocupaban un área total de  $15649 \pm 366,3 \mu\text{m}^2$  por campo de 20x. En los hígados de *L. chaquensis* provenientes CA no se registraron alteraciones hepatocíticas, pero sí aumentos significativos en el número  $128 \pm 3,4$  ( $p=0,0287$ ) y área ocupada por MM,  $23725 \pm 728,53 \mu\text{m}^2$  ( $p=0,0171$ ) (Imagen 2, gráficos 1).



**Imagen 2:** MM en ranas de SR (A) y CA (B). HE, 20x. Se observa aumento en la cantidad de MM en ranas de CA.



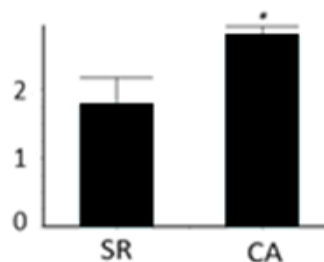
**Grafico 1:** Área ocupada por MM por campo de 20x. \*  $p < 0,05$  vs SR.

**Enzimas de daño oxidativo:** Se observó reducción significativa en la actividad de la Glutación-S-transferasa (SOD) en los individuos de *L. chaquensis* de arroceras  $417,72 \pm 28$  frente a los individuos de SR  $500,3 \pm 41$  ( $p < 0,05$ ). No se observaron diferencias significativas en la actividad de la catalasa ( $p > 0,05$ ).

**Evaluación de micronúcleos:** En los extendidos sanguíneos de *L. chaquensis* provenientes de CA se observó un aumento significativo en la cantidad de micronúcleos por cada 1000 eritrocitos  $2,77 \pm 0,14$ , frente a las *L. chaquensis* de SR  $1,77 \pm 0,4$  ( $p = 0,0454$ ) (Grafico 2. Imagen 3).



**Imagen 3:** Extendido sanguíneo, *L. chaquensis* de CA 100x. Eritrocito con un micronúcleo (flecha).



**Grafico 2:** Frecuencia de micronúcleos por cada 1000 eritrocitos. \*  $p < 0,05$  vs SR.

## CONCLUSIÓN

El aumento en el infiltrado mononuclear evidenció un proceso inflamatorio hepático en ejemplares de *L. chaquensis* provenientes de arrozceras. Esto podría deberse al intenso uso del insecticida clorpirifos, que ha sido señalado como tóxico hepático, y puede producir hepatitis por toxicidad directa y aumento del estrés oxidativo, a través de la inhibición de enzimas antioxidantes, en ratas y seres humanos (Adan et al., 2005). En este sentido, las ranas expuestas a arrozceras presentaron reducción en la actividad de la SOD, enzima antioxidante, lo cual avala lo dicho anteriormente. Por otra parte, el estrés oxidativo estimula el aumento de los MM (Fenoglio et al., 2005), hecho que estaría íntimamente relacionado con el aumento observado de los mismos en individuos de *L. chaquensis* de arrozceras, ya que estos cumplen un importante papel en el sistema antioxidante no enzimático. Por otra parte, se observó un aumento en la frecuencia de micronúcleos en los animales de las arrozceras. Esto muestra que existen efectos genotóxicos sobre células proliferantes, producidos través de la escisión de ADN y/o del huso mitótico (Norppa y Falck, 2003). Si bien existen factores bióticos y abióticos en el ecosistema en el cual se desarrollaron los individuos que pueden alterar la salud de los mismos, los cambios observados fueron descriptos en otras especies de anuros que habitan en agroecosistemas con intenso uso de agroquímicos. Por ello, podemos concluir que los efectos histopatológicos y genotóxicos descriptos exponen el potencial riesgo ecotoxicológico generado por los biocidas utilizados en los cultivos de arroz.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adán Merino L., Gómez Senent S., Gea Rodríguez F., Alonso Gamarra E., Martín Arranz E., Segura Cabral J.M., 2010. Necrosis hepática secundaria a intoxicación por organofosforados. Rev. esp. enferm. dig. 102 (4): 285-286.
- Aebi H., 1984. Catalase in vitro. Met.Enzymol. 105: 121–126.
- Al-Sabti K., Metcalfe C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutat. Res. 343: 121 - 135.
- ASIH., HL., SSAR., 2004. Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research <http://www.asih.org/files/hacc-final.pdf>
- Fenoglio C., Boncompagnia E., Fasola M., Gandini C., Comizzoli S., Milanese G., 2005. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 60: 259–268.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W., 1974. GlutathioneS-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249: 7130–7139.
- Marques S.M., Antunes S.C., Pissarra H., Pereira M.L., Gon F., Alves R., Pereira R., 2009. Histopathological changes and erythrocytic nuclear abnormalities in Iberian green frogs (*Rana perezi Seoane*) from a uranium mine pond. Aquatic Toxicology 91: 187–195.
- Norppa H., Falck C.M., 2003. What do human micronuclei contain? Mutagenesis 18: 221–233.
- Poletta G.L., 2011. Monitoreo de daño inducido por plaguicidas en *Caiman latirostris* (yacaré overo) como organismo centinela de los humedales de argentina. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires.
- Sans F.X., 2007. La diversidad de los agroecosistemas. Ecosistemas 16: 44–49.
- Udroui I., 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. Aquat. Toxicol. 79: 201-204.
- United States Environmental Protect Agency U.S.EPA., 2002. Methods for evaluating Wetland Condition: using Amphibian in Bioassessments of Wetland. Office of water, U.S. Envionmental Protection Agency, Washington DC.EPA-822-R-02-022.