

ANALYSIS OF GENOTOXICITY IN ERITHROCYTES OF TURTLES (*Phrynops hilarii*) FROM ANTHROPIZED AND NATURAL SITES OF ENTRE RÍOS, ARGENTINA



ANÁLISIS DE GENOTOXICIDAD EN ERITROCITOS DE TORTUGAS (*Phrynops hilarii*) DE SITIOS ANTROPIZADOS Y NATURALES DE ENTRE RÍOS, ARGENTINA

Castaño G. V.¹, Cabagna Zenklusen M.², Prieto Y.¹, Manzano A. S.¹

¹ Centro de Investigaciones Científicas y Transferencia de Tecnología a la Producción (CICYTTP-CONICET- UADER), Matero y España, Diamante, Entre Ríos, Argentina.

² Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Paraje el Pozo s/n, Santa Fe, Argentina.

Corresponding author:
Adriana Silvina Manzano
cidmanzano@infoaire.com.ar

 ORCID 0000-0002-6862-857X

Cite this article as:

Castaño G. V., Cabagna Zenklusen M., Prieto Y., Manzano A. S. 2020. ANALYSIS OF GENOTOXICITY IN ERITHROCYTES OF TURTLES (*Phrynops hilarii*) FROM ANTHROPIZED AND NATURAL SITES OF ENTRE RÍOS, ARGENTINA. BAG. Journal of Basic and Applied Genetics XXXI (1): 15-22.

Received: 10/22/2019

Revised version received: 03/03/2020

Accepted: 03/15/2020

General Editor: Elsa Camadro

DOI: 10.35407/bag.2020.31.01.02

ISSN online version: 1852-6233

Available online at
www.sag.org.ar/jbag

ABSTRACT

The micronucleus test (MN) is a biomarker of non-destructive genotoxicity that allows chromosomal damage and other nuclear alterations (NA) to be detected. *Phrynops hilarii* is a freshwater chelonium that inhabits regions of central-northern Argentina. The main objective was to determine the presence of MN and other NA in erythrocytes of natural populations of *P. hilarii* comparing their frequencies between three sites, two anthropized and one of control (cities of Diamante and Paraná) of Entre Ríos, Argentina, during the period 2015-2016. Eighteen individuals (six per sampling site) were evaluated at the sites: 1- PD: Pre-Delta National Park (control), 2- AG: Salto Ander Egg (agroecosystem) and 3- SU: Caleta Club Náutico (urban system). Blood was obtained from the femoral vein. The samples were stained with the May Grünwald-Giemsa method and observed under a microscope with an immersion objective. Micronucleus (MNF) and nuclear alterations (NAF) frequencies were determined every 1000 erythrocytes observed. A significant difference ($p < 0.05$) was found between the PD site and the other sites (AG and SU), both for MNF ($p = 0.0021$) and for NAF ($p = 0.0011$). The highest frequency values corresponded to the AG site (MNF: 3.33 ± 0.62 ; NAF: 4.67 ± 0.56). Finally, biomonitoring with *P. hilarii* was useful, so it could be considered as a bioindicator species to assess the quality of Argentina's environments.

Key words: Genotoxicity biomarkers, micronucleus test, nuclear alterations

RESUMEN

El test de micronúcleos (MN) es un biomarcador de genotoxicidad no destructivo que permite detectar daño cromosómico y otras alteraciones nucleares (AN). *Phrynops hilarii* es un quelonio de agua dulce que habita regiones del centro-norte de Argentina. El objetivo principal fue determinar la presencia de MN y otras AN en eritrocitos de poblaciones naturales de *P. hilarii* comparando sus frecuencias entre tres sitios, dos antropizados y uno de control (ciudades de Diamante y Paraná) de Entre Ríos, Argentina, durante el periodo 2015-2016. Dieciocho individuos (seis por sitio de muestreo) fueron evaluados en los sitios: 1- PD: Parque Nacional Pre-Delta (control), 2- AG: Salto Ander Egg (agroecosistema) y 3- SU: Caleta Club Náutico (sistema urbano). Se extrajo sangre de la vena femoral. Las muestras se tiñeron con el método May Grünwald-Giemsa y se observaron bajo un microscopio con el objetivo de inmersión. Las frecuencias de micronúcleos (FMN) y alteraciones nucleares (FAN) se determinaron cada 1000 eritrocitos observados. Se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el sitio PD y los otros sitios (AG y SU), tanto para FMN ($p = 0,0021$) como para FAN ($p = 0,0011$). Los valores de las frecuencias más altos correspondieron al sitio AG (FMN: $3,33 \pm 0,62$; FAN: $4,67 \pm 0,56$). Finalmente, el biomonitoreo con *P. hilarii* fue útil, por lo que podría considerarse como especie bioindicadora para evaluar la calidad de los ambientes de Argentina.

Palabras clave: biomarcadores de genotoxicidad, prueba de micronúcleos, alteraciones nucleares

INTRODUCCIÓN

El test de micronúcleos (MN) es un biomarcador de genotoxicidad no destructivo que puede aplicarse en distintos tipos de células (epiteliales, sanguíneas, sexuales, entre otras) y organismos (animales, vegetales y humanos), para detectar daño cromosómico (Pastor Benito, 2002; Poletta, 2011; Lajmanovich *et al.*, 2012; Caraffa *et al.*, 2013). Este test, es un método sensible y rápido que puede realizarse tanto en ensayos de laboratorio como a campo, sin necesidad de sacrificar al individuo en evaluación para la obtención de la muestra (Lajmanovich *et al.*, 2012; Zapata Restrepo *et al.*, 2017). Esto es de gran importancia, ya que puede emplearse en sucesivos muestreos y en especies con escaso número de individuos o en peligro de extinción (Lajmanovich *et al.*, 2012).

Los MN son masas de cromatina con forma de pequeños núcleos cercanos al núcleo principal en las células de la interfase, pudiendo originarse de manera espontánea o como respuesta a la acción de ciertos agentes (Pastor Benito, 2002) como pueden ser los hidrocarburos (Barsiené y Andreikénaité, 2007), metales (Paolín *et al.*, 2010), plaguicidas (Pastor Benito, 2002; Lajmanovich *et al.*, 2014), fármacos (Arranz Gutiérrez, 2016), entre otros. Cuando esto ocurre, el material genético queda excluido de los núcleos de las nuevas células durante la anafase mitótica, dando lugar a formaciones redondas en el citoplasma de la célula hija. El material genético desprendido puede tener dos orígenes: 1- derivar de cromosomas enteros (efecto aneugénico), donde el daño genotóxico ha afectado a proteínas del cinetocoro, al centrómero o al huso mitótico, generando un retraso mitótico y un desequilibrio en la distribución de los cromosomas, 2- pueden formarse de fragmentos cromosómicos acéntricos que han sido excluidos de los núcleos de las nuevas células (efecto clastogénico) durante la anafase mitótica (Cabagna Zenklusen, 2012).

Numerosos trabajos en fauna han aplicado el test de MN en eritrocitos, para evaluar a través de su frecuencia (FMN) los efectos provocados por distintos agentes en el material genético y en la división celular (Pollo *et al.*, 2012; Caraffa *et al.*, 2013; Latorre *et al.*, 2015). Para determinar el potencial de una especie como organismo bioindicador o centinela se utiliza como valor referencia la frecuencia basal de micronúcleos (FBMN). Este valor refiere al número de MN provocados de manera espontánea como resultado de procesos normales de replicación y/o división celular (Cabagna Zenklusen, 2012; Latorre *et al.*, 2015).

Otras alteraciones nucleares (AN) pueden analizarse al aplicar el test de MN y son utilizadas como un complemento, ya que en varios estudios fueron señaladas como respuesta a la acción de determinados agentes tóxicos (Ayllon y García Vázquez, 2000; Cabagna Zenklusen, 2012; Hayretdağ *et al.*, 2014;

Hernández Guzmán *et al.*, 2015). Se consideran como AN las siguientes características descritas por Carrasco *et al.* (1990): 1- núcleo escotado (KN): invaginación relativamente pequeña en la membrana nuclear y cromatina no condensada; 2- núcleo mellado (EN): presencia de una muesca en el núcleo; 3- lóbulo o brote nuclear (LN): morfología semejante a un MN conectado o unido al núcleo; 4- célula binucleada (BN): célula con presencia de dos núcleos de tamaños semejantes o similares. El mecanismo por el cual se producen las AN no es conocido con claridad. López González *et al.* (2017) mencionaron que cuando la célula detecta una región de ácido desoxirribonucleico (ADN) afectada, se inicia un proceso de reparación y eliminación de la cromatina. La región alterada se mueve a la periferia del núcleo y se elimina por exocitosis. Antes de que el proceso de reparación y eliminación de la cromatina culmine, la membrana nuclear presenta algunas imperfecciones, ocasionando AN.

Los agentes genotóxicos son sustancias que pueden actuar de forma directa o indirecta sobre el material genético (ADN) y provocar efectos a concentraciones subletales (Gutiérrez, 2013). Estos agentes pueden ser liberados al ambiente por distintas actividades humanas, ya sean productivas como la minería, la agricultura y distintos procesos industriales o por actividades urbanas como el vertido de efluentes cloacales, emisiones vehiculares, aguas residuales hospitalarias y de estaciones de combustible, entre otras (Paz *et al.*, 2008; Zuluaga Quintero *et al.*, 2009; Gutiérrez, 2013; González Torres *et al.*, 2015). Para evaluar el riesgo potencial de poblaciones naturales expuestas a agentes genotóxicos, son utilizadas especies indicadoras o centinelas y distintos biomarcadores, ya que suministran señales de alarma temprana ante la presencia de tóxicos (Cabagna Zenklusen, 2012; Caraffa *et al.*, 2013).

Los reptiles son organismos muy sensibles a cambios en las condiciones del ambiente, por lo que en muchos casos fueron utilizados como indicadores o centinelas de contaminación, debido a que presentan características como: poblaciones persistentes en diferentes hábitats (acuáticos y terrestres), longevidad, posición alta en la cadena alimentaria, alta sensibilidad a contaminantes, amplia distribución geográfica y fidelidad al sitio (Gardner y Oberdorster, 2005; Poletta *et al.*, 2008; Poletta *et al.*, 2013). Dentro de estos, las tortugas han sido propuestas como organismos bioindicadores y/o centinelas para evaluar su exposición a sustancias tóxicas (Andreani *et al.*, 2007; De Solla *et al.*, 2007; De Solla *et al.*, 2008; Latorre *et al.*, 2015).

Phrynops hilarii es un quelonio de agua dulce perteneciente al orden Testudines, suborden Pleurodira y familia Chelidae. La distribución geográfica de la especie abarca algunas regiones de Sudamérica (Latorre *et al.*, 2015).

Particularmente en Argentina se la puede encontrar en áreas de la región centro-norte del país entre las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Corrientes, Santa Fe, Córdoba, Misiones, Chaco, Formosa, Santiago del Estero y Mendoza (Derocco *et al.*, 2005). Las áreas que habita pueden presentar distintas condiciones topográficas, fisicoquímicas, entre otras, como lagunas, esteros, arroyos lentos, ríos, cursos fluviales con lecho de fango o arena y bañados asociados a juncos y vegetación flotante; además, se la puede encontrar en áreas antropizadas como arrozales, cuneta al borde de campos cultivados y tajamares, en los cuales se encuentra especialmente expuesta a sustancias tóxicas (Ceí, 1993; Cabrera, 1998; Richard y Waller, 2000; Carreira *et al.*, 2005; Tortato, 2007).

Los estudios de genotoxicidad basados en la aplicación del test de MN y la evaluación de otras AN en reptiles de Argentina, son recientes (Poletta *et al.*, 2008; Poletta *et al.*, 2009; Poletta, 2011; Shaumburg *et al.*, 2012; López González *et al.*, 2013; Shaumburg *et al.*, 2014; Shaumburg *et al.*, 2016; López González *et al.*, 2017). En lo que respecta a tortugas de nuestro país, los datos hallados son escasos y acotados a la descripción de la FBMN y a la FMN en *P. hilarii* y *Trachemys dorbigni* en condiciones de cautiverio, sin indagar en la descripción de otras AN (Boned *et al.*, 2011; López González *et al.*, 2012; Latorre *et al.*, 2015). El objetivo principal de este trabajo fue determinar la presencia de MN y otras AN en los eritrocitos de poblaciones naturales de *Phrynops hilarii* comparando sus frecuencias entre sitios antropizados y control (en las ciudades de Diamante y Paraná) de Entre Ríos, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y sitios de muestreo

El estudio se realizó en un área comprendida entre los departamentos Diamante y Paraná de la provincia de Entre Ríos, Argentina. Los sitios seleccionados fueron dos zonas antropizadas y una de control: 1- PD: Parque Nacional Pre-Delta (control, 32° 03' 43" S y 60° 38' 39" O), 2- AG: Salto Ander Egg (agroecosistema, 32° 07' 42.64" S y 60° 25.40' 13" O) y 3- SU: Caleta Club Náutico (sistema urbano, 31°42' 55" S y 60° 30' 17" O), durante los meses cálidos (Octubre-Marzo) de los años 2015 y 2016 (Figura 1). Los sitios pertenecen a la ecorregión Delta e Islas del Paraná y Espinal (Burkart *et al.*, 1999), con temperaturas medias anuales inferiores a los 20°C y las precipitaciones medias anuales abarcan un periodo de mayor frecuencia entre los meses de octubre-abril (73% del total anual), sin embargo, en los meses de verano pueden presentarse lapsos de déficit hídrico (Rojas y Saluso, 1987). El uso intensivo de la tierra en estas regiones, le da al paisaje un perfil muy antrópico, debido a que se encuentra principalmente ocupado por

superficies agrícolas, pasturas implantadas y en menor medida, por pasturas y bosques naturales, así como también, por áreas industriales y urbanas, con sitios de parches dispersos de bosques nativos (Aceñolaza y Rodríguez, 2013).

Captura de individuos y extracción de sangre

Se capturaron 18 individuos (seis por sitio de muestreo) con trampas tipo embudo (Aguirre León, 2011) a las que se les agregó cebos atrayentes (trozos de peces). De cada individuo se registró el largo curvilíneo del caparazón (LC, mm) con un centímetro de 1mm de precisión. El peso corporal (MC, kg) de los individuos se registró con balanza manual electrónica con 0,01 kg de precisión. Los animales fueron marcados en el borde de su caparazón mediante la realización de una pequeña muesca con sierra manual para el control de recapturas.

La extracción de sangre se realizó de la vena femoral con jeringas estériles de 1ml previamente heparinizadas (anticoagulante) y aguja TERUMO® 25G 0.5mm, sin anestésicos para evitar la alteración de los componentes de la sangre (Duguay, 1982; Troiano y Silva, 1998; Attademo *et al.*, 2012). Todos los animales luego de la extracción fueron reincorporados a su lugar. Las muestras fueron llevadas refrigeradas al Laboratorio de Muestras Biológicas del Centro de Investigaciones Científicas y Transferencia de Tecnología a la Producción (CICYTTP-CONICET) de la ciudad de Diamante, Entre Ríos, para su posterior procesamiento. Para las actividades y manipulación de los animales se siguieron los Principios Éticos para la Investigación en el Laboratorio, Granja y Animales Silvestres (REFBR-CONICET, 2005), y se contaron con los permisos correspondientes de la Dirección Recursos Naturales de la provincia de Entre Ríos (Resolución N°1721) y de la Administración de Parque Nacionales (N° CRCE 6).

Test de micronúcleos

Para la evaluación de MN y otras AN a través del test de MN, se prepararon extendidos sanguíneos de cada uno de los individuos en portaobjetos limpios y secados al aire. Posteriormente se tiñeron con solución May Grünwald-Giemsa y se observaron en un microscopio Carl Zeiss Axiostar con objetivo de inmersión.

Para el conteo de MN se seleccionaron los eritrocitos intactos y se reconocieron siguiendo los criterios descritos por Fenech (2000), donde señala que el diámetro del MN no debe superar el 1/6 o 1/3 del tamaño del núcleo principal y debe estar separado de este y presentar una morfología, coloración e intensidad similar a la del núcleo principal.

Para determinar la FMN de las muestras por sitio, se realizó el conteo de la cantidad de células que presentaron MN en 1000 eritrocitos observados por frotis de cada individuo (López González *et al.*, 2017).

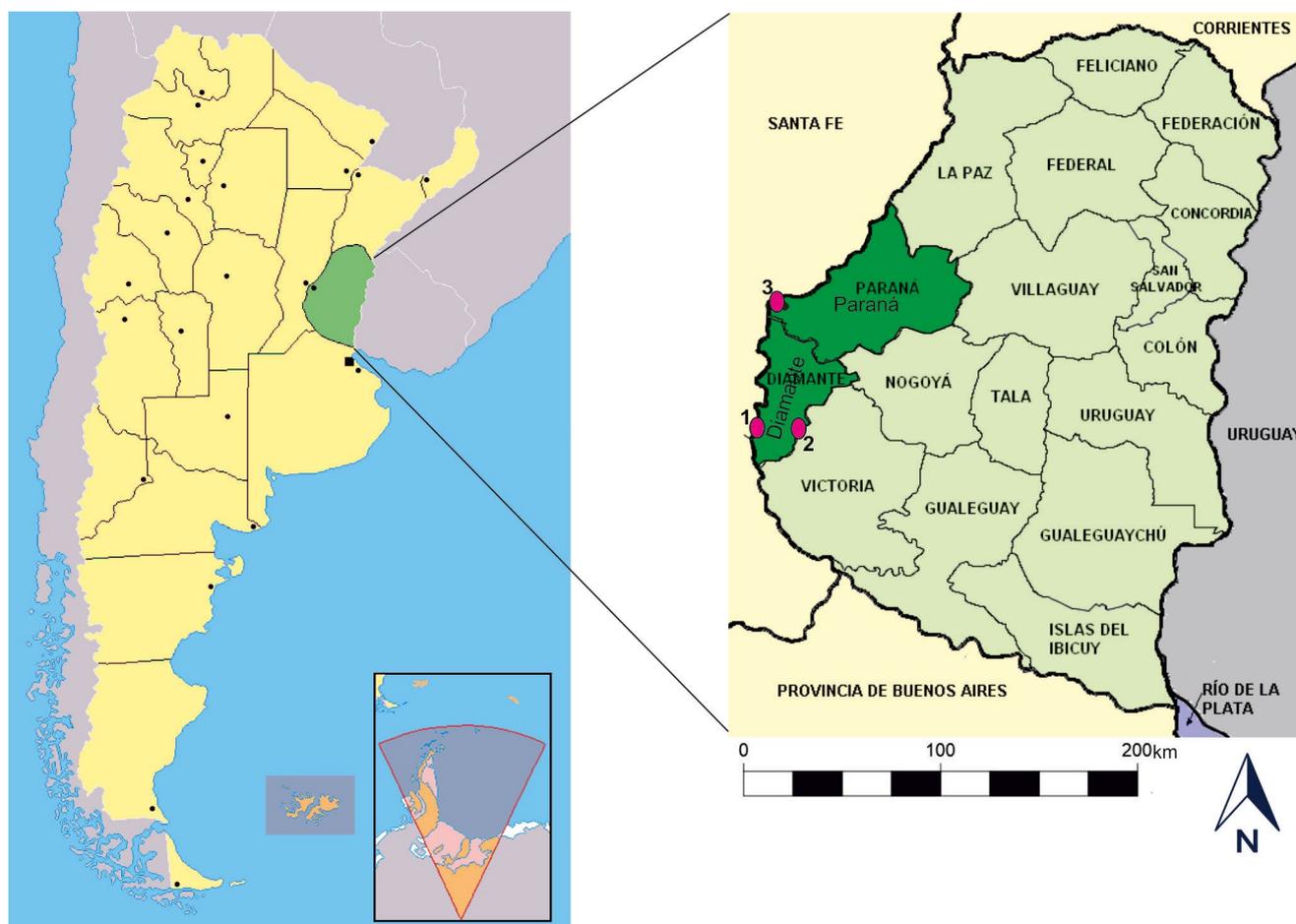


Figura 1. Área de estudio y sitios de muestreo. 1-Parque Nacional Pre Delta (sitio control). 2-Salto Ander Egg (sitio agroecosistema). 3-Caleta Club Náutico (sitio urbano).

La FAN total se obtuvo sumando todas las AN que se observaron en las muestras de los seis individuos de cada área y se expresaron cada 1000 eritrocitos contados por individuo por sitio (Cabagna Zenklusen *et al.*, 2011).

Análisis estadístico

Los datos descriptivos de los individuos a los que se extrajeron las muestras son: media \pm error estándar (EE) y tamaño de la muestra (n). Los datos fueron testeados en cuanto a su normalidad (Shapiro-Wilks) y homocedasticidad (test de Levene). Para las comparaciones de medias se utilizó el test no paramétrico Kruskal Wallis ($p < 0,05$). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software estadístico INFOSTAT versión 2012 profesional (Di Rienzo *et al.*, 2012).

RESULTADOS

En la Tabla 1 se consignan los valores de los parámetros biológicos determinados en los individuos analizados de cada sitio. En los extendidos sanguíneos analizados

se distinguieron tres tipos de AN: eritrocito con brote nuclear (LN), eritrocito con núcleo mellado (EN) y eritrocito con micronúcleo (MN) (Figura 2).

En la Tabla 2 se exponen los valores de la FMN, FAN, LN y EN de los sitios muestreados. En el sitio control (PD), los datos corresponden a los resultados basales de las frecuencias en este sitio.

Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el sitio PD y los otros sitios (AG y SU), tanto para la FMN ($p = 0,0021$) como para la FAN ($p = 0,0011$), mientras que para los demás parámetros celulares (LN y EN) no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los sitios. Entre las áreas antropizadas, los mayores registros de las frecuencias correspondieron al sitio AG. Además, no se encontró correlación entre los parámetros biológicos (MC y LC de *P. hilarii*) y las frecuencias de MN y de AN de los sitios AG (MC-FMN: $r^2 = 0,62$ y LC-FMN: $r^2 = 0,31$; MC-FAN: $r^2 = 0,24$ y LC-FAN: $r^2 = 0,24$), SU (MC-FMN: $r^2 = -0,72$ y LC-FMN: $r^2 = -0,60$; FAN-MC: $r^2 = -0,03$ y FAN-LC: $r^2 = 0,09$) y PD (FMN-MC: $r^2 = 0,13$ y FMN-LC: $r^2 = -0,39$; FAN-MC: $r^2 = 0,29$ y FAN-LC: $r^2 = 0,10$).

Tabla 1. Parámetros biológicos de *P. hilarii*, peso corporal (MC) y longitud caparazón (LC). Sitios: control (PD), agroecosistema (AG) y sistema urbano (SU). *n*: tamaño de la muestra. Los valores se expresaron como media ± EE.

| SITIOS | <i>n</i> | MC (Kg) | LC (mm) |
|--------|----------|-------------|----------------|
| PD | 6 | 2,36 ± 0,38 | 316,33 ± 9,01 |
| AG | 6 | 1,62 ± 0,64 | 216,17 ± 34,31 |
| SU | 6 | 1,99 ± 0,49 | 281,50 ± 26,68 |

Tabla 2. Parámetros celulares evaluados en *P. hilarii*. FMN: frecuencia de micronúcleos; FAN: frecuencia de alteraciones nucleares; LN: lóbulo nuclear; EN: núcleo mellado; en 1000 eritrocitos contados por muestra. Sitios: control (PD), agroecosistema (AG) y sistema urbano (SU). *n*: tamaño de la muestra. Todos los valores se expresaron como media ± EE. Superíndices a y b en las columnas señalan diferencias significativas entre los sitios ($p < 0,05$). (*) Sin diferencias significativas.

| SITIOS | <i>n</i> | FMN | FAN | LN* | EN* |
|--------|----------|--------------------------|--------------------------|-------------|-------------|
| PD | 6 | 0,17 ± 0,17 ^a | 0,50 ± 0,22 ^a | 0,33 ± 0,21 | 0 |
| AG | 6 | 3,33 ± 0,62 ^b | 4,67 ± 0,56 ^b | 1,17 ± 0,40 | 0,17 ± 0,17 |
| SU | 6 | 2,00 ± 0,36 ^b | 2,67 ± 0,42 ^b | 0,50 ± 0,22 | 0,17 ± 0,17 |

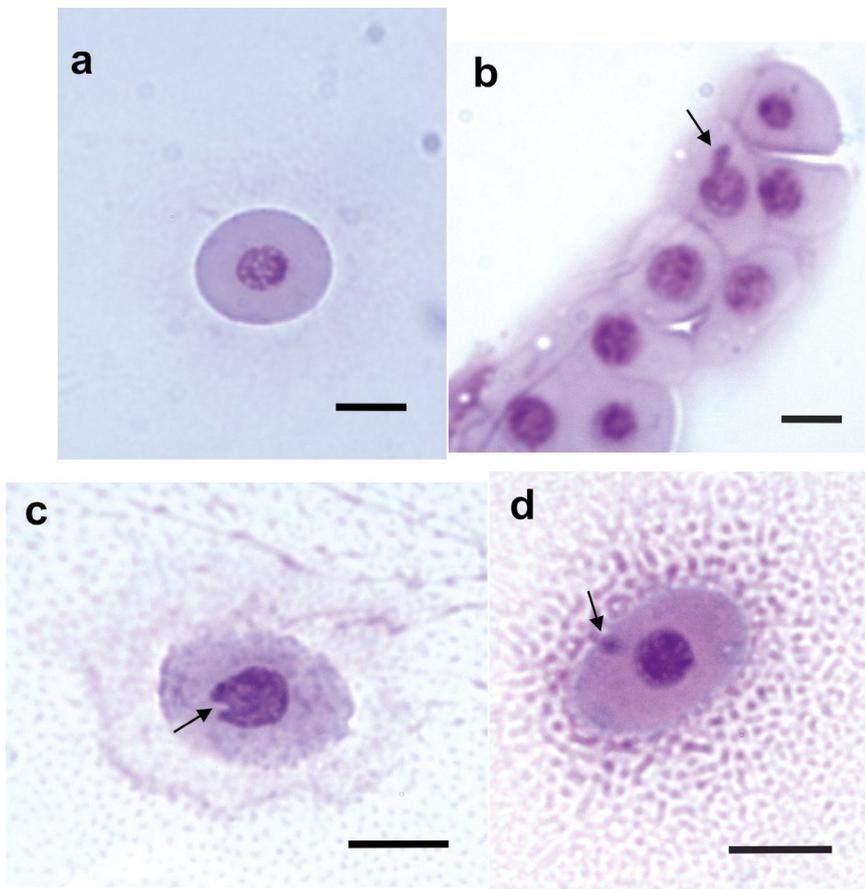


Figura 2. Eritrocitos de *Phrynosoma hilarii*: a) normal; b) eritrocito con brote; c) eritrocito con núcleo mellado; d) eritrocito con micronúcleo. Escala: 5µm.

DISCUSIÓN

Actualmente existe un gran interés en estudios ecotoxicológicos con reptiles, debido a que las características fisiológicas y ecológicas que presentan, permiten evaluar el estado de contaminación de un ambiente (Quiróz Herrera y Palacio Baena, 2017).

Varios autores han aplicado el test de MN (Zúñiga González *et al.*, 2000; 2001; Poletta, 2011; Shaumburg *et al.*, 2012; 2014; Zapata *et al.*, 2016; López González *et al.*, 2017), y de otras AN (Strunjak Perovic *et al.*, 2010; Hayretđag *et al.*, 2014; Hernández Guzmán *et al.*, 2015; López González *et al.*, 2017) en caimanes, serpientes y en otras especies de tortugas.

Los resultados de la FMN obtenidos del sitio PD (control) del presente trabajo fueron tomados como valores basales, al igual que la FAN para dicho sitio, debido a que no hay antecedentes hasta el momento de valores basales en individuos de *P. hilarii* en la naturaleza (Tabla 2). Los datos de FBMN obtenidos, fueron menores en comparación con los reportados por los autores Boned *et al.* (2011) y Latorre *et al.* (2015) para individuos de esta especie en condiciones de cautiverio. Asimismo, se encontró en el trabajo de Zapata *et al.* (2016) que la FBMN obtenida de individuos de *Trachemys callirostris* expuestos a las actividades agrícolas, industriales y mineras fue mayor que el resultado obtenido en el presente estudio; de igual manera ocurrió en el trabajo de Da Silva Silveira (2016), en el cual la FBMN obtenida de las especies: *Chelonia mydas*, *Caretta caretta* y un híbrido entre las especies *C. caretta* y *Lepidochelys olivácea* de áreas expuestas a descargas de contaminantes de residuos sólidos y metales pesados fueron mayores a las del presente trabajo.

Por otra parte, Zúñiga González *et al.* (2000; 2001) informaron valores de la FBMN para varias especies de vertebrados tanto en la naturaleza como en cautiverio, en el cual, detallaron datos para dos especies de tortugas de agua dulce *Macrolemys temminckii* y *Kinosternon subrubrum*, cuyos valores reportados fueron nulos, pudiendo deberse estos resultados al bajo número de individuos analizados, ya que los autores utilizaron un individuo de la primera especie mencionada y dos de la segunda (Poletta, 2011).

En lo que respecta a la FBAN, los datos obtenidos en el presente trabajo son los primeros en tortugas *P. hilarii* de poblaciones naturales, ya que solamente se encontró en la bibliografía el trabajo de Da Silva Silveira (2016), en el cual describe eritrocitos con brotes además de los MN

en las especies anteriormente mencionadas (*C. mydas*, *C. caretta* y un híbrido entre *C. caretta* y *L. olivácea*).

Los autores Matson *et al.* (2005) determinaron la FMN en las tortugas *Emys orbicularis* expuestas a descargas industriales y Borrat *et al.* (2011) en la especie *C. mydas* expuesta a las actividades agrícolas, y Quiroz Herrera y Palacio Baena (2017) en *L. olivácea* para determinar efectos genotóxicos de contaminantes en una zona expuesta a los agroquímicos y metales pesados.

Las FMN obtenidas de las tortugas de los trabajos de Matson *et al.* (2005) y Borrat *et al.* (2011), fueron superiores a los valores obtenidos de los sitios antropizados (AG y SU). No obstante, en el estudio de Quiroz Herrera y Palacio Baena (2017), los resultados de sus análisis fueron bajos en relación a los valores de los sitios AG y SU.

Finalmente, las muestras analizadas de *P. hilarii* del sitio PD tuvieron escasas AN, lo cual, podría asociarse a eventos espontáneos (Cabagna Zenklusen, 2012), ya que las tortugas capturadas en esta área (Parque Nacional), corresponden a un sitio protegido, relativamente alejado de campos agrícolas e industrias.

El aumento de las frecuencias de MN y AN observadas en *P. hilarii* de los sitios AG y SU, podrían estar asociadas fuertemente a las actividades náuticas y agrícolas, produciendo un incremento de las alteraciones con respecto a las frecuencias obtenidas en el sitio PD. Estos resultados, coinciden con algunos de los trabajos anteriormente mencionados, como los de Matson *et al.* (2005), Hayretđag *et al.* (2014) y López González *et al.* (2017), ya que en los mismos, los sitios utilizados en sus estudios, expuestos a contaminantes o ensayos de laboratorio por inducción a tóxicos, produjeron un aumento en las frecuencias de MN y AN con respecto a sus controles.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, consideramos que el biomonitoreo realizado con *P. hilarii* fue útil, por lo que podría ser utilizada como especie bioindicadora para evaluar calidad de los ambientes de Argentina. Si bien el número de individuos analizados fue bajo, cabe resaltar que estos animales se encontraban en libertad, expuestos naturalmente a las condiciones de los ambientes que habitan. En este contexto, este trabajo es el primero de este tipo, y consideramos que ampliar el número de individuos y sitios de estudio podría incrementar el valor de los resultados hallados, y es un desafío que nos planteamos para futuros trabajos en el área de estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Aceñolaza P.G., Rodríguez E.E. (2013) Humedales de los tributarios cortos del río Paraná. En: Benzaquén L., Blanco D., Bó R., Kandus P., Lingua G., Minotti P., Quintana R.D., Sverlij S., Vidal L. (Eds.) Inventario de los humedales de Argentina: sistemas de paisajes de humedales del corredor fluvial Paraná-Paraguay. Buenos Aires, Argentina. pp. 245-252.
- Aguirre León G. (2011) Métodos de estimación, captura y contención de anfibios y reptiles. En: Gallina S., López González C. (Eds.) Manual de técnicas para el estudio de la fauna. Volumen I. Universidad Autónoma de Querétaro-Instituto de Ecología, A.C. Querétaro, México, pp. 61-85.
- Andreani G., Santoro M., Cottignoloc S., Fabbri M., Carpené E., Elsaní G. (2007) Metal distribution and metallothionein in loggerhead (*Caretta caretta*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. *Sci Total Environ.* 390 (1): 287-294.
- Arranz Gutiérrez P. (2016) Evaluación de la posible capacidad genotóxica de fármacos antihipertensivos: losartán e irbesartán. Tesis de Grado, Universidad del País Vasco.
- Attademo A.M., Lajmanovich R.C., Peltzer P.M., Bassó A., Junges C., Cabagna Zenklusen M. (2012) Plasma b-esterase and glutathione s-transferase activities in the South American reptiles *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae) and *Phrynos hilarii* (Testudines, Chelidae). *Water Air Soil Pollut.* 223 (6): 3321-3331
- Ayllon F., García Vázquez E. (2000) Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European mirrow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutat. Res.* 467: 177-186
- Barsiené J., Antdreikénaité L. (2007) Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in blue mussels exposed to crude oil from the North Sea. *Ekologija.* 53:9-15
- Boned M.J., López González E., Latorre M.A., Poletta G.L., Siroski P.A. (2011) Determinación del valor basal de micronúcleos (MN) en la tortuga de laguna (*Phrynos hilarii*). *J. Basic Appl. Genet.* 40: 19
- Borrat V., Villar S., Marquez A., Martínez Souza G., Fallabrino A., Novello A. (2011) Evaluación del estado de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) mediante el uso de biomarcadores de genotoxicidad en el área protegida "Cerro verde e islas de La Coronilla" próximas al canal Andreoni. V Jornada sobre Tartarugas Marinhas do Atlântico Sul Ocidental 27-28 de Noviembre de 2011, Florianópolis, Brasil; pp. 88-92.
- Burkart R., Barbaro N.O., Sánchez R.O., Gómez D.A. (1999) Eco-regiones de la Argentina. Ed. PRODIGIA. Buenos Aires, Argentina.
- Cabagna Zenklusen M.C. (2012) Caracterización hematológica de especies de anfibios anuros con distribución en los ecosistemas del litoral fluvial argentino (provincias de Entre Ríos y Santa Fe). Potencialidad de su utilización como biomarcadores. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Santa Fe, Argentina.
- Cabagna Zenklusen M.C., Lajmanovich C.R., Attademo A.M., Peltzer P.M., Junges C.M., Fiorenza Biancucci G., Bassó A. (2011) Hematología y citotóxica de las células sanguíneas de *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae) en Espinal y Delta-Islands del río Paraná, Argentina. *Rev. Biol. Trop.* 59 (1): 17-28
- Cabrera R.M. (1998) Las tortugas continentales de Sudamérica austral. Talleres gráficos BR Copias, Córdoba, Argentina.
- Caraffa E., Bionda C., Pollo F.E., Salas N.E., Martino A.L. (2013) Determinación de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de *Bufo arenarum* que habitan ambientes urbanizados. *Acta Toxicol. Argent.* 21(2): 78-84
- Carrasco K.R., Tilbury K.L., Mayers M.S. (1990) Assessment of the piscine micronuclei test as an in-situ biological indicator of chemical contaminants effects. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 47: 2123-2136
- Carreira Vidal S., Meneghel M., Achaval F. (2005) Notas descriptivas y biológicas. En: Elbert L. (Ed.) Reptiles de Uruguay. Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay, pp. 97-100.
- Cei J.M. (1993) Reptiles del noroeste, nordeste y este de Argentina. Herpetofauna de las selvas subtropicales, puna y pampas. Museo Regionale di Scienze Naturali di Torino, Monografía XIV, Torino.
- Da Silva Silveira E. (2016) Avaliação dos danos mutagênicos através da análise de micronúcleos em eritrócitos de tartarugas marinhas no Litoral Norte e Médio Leste do Rio Grande do Sul, Brasil. Monografía, Universidad Estatal de Rio Grande do Sul, en convenio con la Universidad Federal de Rio Grande do Sul, Brasil.
- De Solla R., Fernie K.J., Letcher S.G., Chu K.G., Drovillard K.G., Shahmiri S. (2007) Snapping turtles (*Chelydra serpentina*) as bioindicators in canadian areas of concern in the great lakes basin. 1. Polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticides in eggs. *Rev. Environ. Sci. Technol.* 41(21): 7252-7259
- De Solla S.R., Fernie K.J., Asphole S. (2008) Snapping turtles (*Chelydra serpentina*) as bioindicators in canadian areas of concern in the great lakes basin. II. Changes in hatching success and hatchling deformities in relation to persistent organic pollutants. *Rev. Environ. Pollut.* 153: 529-536
- Derocco N.N., Alcalde L., Rosset S.D. (2005) Ampliación de la distribución de *Phrynos hilarii* (Pleurodira: Chelidae) en Argentina. *Cuad. herpetol.* 19 (1): 63
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Robledo C.W. (2012) Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Duguay R. (1982) Biology of the Reptilian. Vol. III. New York. Carl Gans (Ed.) Academic Press. New York, pp. 155-188
- Fenech M. (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455:81-95
- Gardner S.C., Oberdorster E. (2005) Toxicology of Reptiles. New perspectives: Toxicology and the Environment. Editorial Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, EE.UU.
- González Torres H., Moreno Rossi A., Quintana Sosa M. (2015) Efecto genotóxico de mezclas complejas de hidrocarburos en trabajadores de estaciones de servicio de gasolina. *Salud Uninorte.* 31: 91-100
- Gutiérrez J. M. (2013) Micronúcleos en peces como indicadores de calidad ambiental en estuarios de la costa uruguaya. Tesis de Pre Grado, Universidad de la República Uruguay, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.
- Hayrettaş S., Gürkan M., Yakin B.Y., Tok C.V. (2014) A preliminary study on micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of some Colubrid snakes from Turkey. *Biharean Biol.* 8 (1): 53-55
- Hernández Guzmán J., Arias Trinidad A., Islas Jesús R.I., Fraire Vázquez A., De La Cruz Izquierdo R.I., García Guzmán N.C., Ruíz X. (2015) Cromosomas, lesión del ADN y malformación nuclear en la tortuga dulceacuícola (Testudines: Kinosternidae). *The Biologist.* 13 (2): 201-211
- Lajmanovich R.C., Peltzer P.M., Attademo A.M., Cabagna Zenklusen M.C., Junges C.M. (2012) Los agroquímicos y su impacto en los anfibios: un dilema de difícil solución. *Rev. Quím. Viva.* 3: 184-198
- Lajmanovich R.C., Cabagna Zenklusen M.C., Attademo A.M., Junges C.M., Peltzer P.M., Bassó A., Lorenzatti E. (2014) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and Glufosinate-ammonium. *Mutat. Res.* 769: 7-12
- Latorre M.A., López González E., Siroski P.A., Poletta G.L. (2015) Basal frequency of micronuclei and hematological parameters in the side-necked turtle (*Phrynos hilarii*). *Acta Herpetol.* 9 (2): 1827-9635

- López González E.C., Latorre M.A., Boned M.J., Poletta G.L., Siroski P. (2012) Determinación de la frecuencia de micronúcleos en dos especies de tortugas acuáticas: (*Phrynops hilarii*) y tortuga pintada (*Trachemys dorsignii*). IV Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC Argentina.
- López González E.C., Latorre M.A., Larriera A., Siroski P.A., 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 E.C., Larriera A., Siroski P.A., Poletta G.L. (2017) Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (Broad snouted caiman) hatchlings after embryonic exposure to different pesticide formulations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 136: 84-91
- Matson C.W., Palatnikov G., Izlamzadeh A., Mc Donald T.J., Autenrieth R.L., Donnelly K.C., Bickham J.W. (2005) Chromosomal damage in two Species of aquatic turtles (*Emys orbicularis* and *Mauremys caspica*) inhabiting contaminated sites in Azerbaijan. *Ecotoxicol.* 14: 1-13
- Paolín R., Cáceres V., Tello A.V., Torres G.A. (2010) Uso de biomarcadores genotóxicos e histopatológicos para evaluar el efecto de metales en tilapia (*Oreochromis niloticus* L.L) presente en la laguna el Sonso (Valle de Cauca). *Rev. Asoc. Col. Cienc.* 22: 109-121
- Pastor Benito S. (2002) Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Ciencias, Departamento de Genética y Microbiología, Barcelona, España.
- Paz M., Magdaleno A., Balbis N., Morehon J. (2008) Genotoxicidad y determinación de compuestos tóxicos en un residuo líquido hospitalario de Buenos Aires, Argentina. *Int. Contam. Ambient.* 24 (2): 79-87
- Poletta G.L., Larriera A., Kleinsorge E., Mudry M.D. (2008) *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of Micronucleus and Comet assay. *Mutat. Res.* 650: 202-209
- Poletta G. L., Larriera A., Kleinsorge E., Mudry M.D. (2009) Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup (glyphosate) in broad-snouted caimán (*Caiman latirostris*) evidenced by the comet assay and the micronucleus test. *Mutat. Res.* 672: 95-102
- Poletta G.L. (2011) Monitoreo de daño inducido por plaguicidas en Caimán *latirostris* (Yacaré overo) como organismo centinela de los humedales de Argentina. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires, Argentina.
- Poletta G.L., Siroski P.A., Amavet P.S., Ortega H.H., Mudry M.D. (2013) Reptiles as animal models: examples or their utility in genetics, immunology and toxicology. En: Lutterschmidt, W (Ed.) *Reptiles in Research: Investigations of Ecology, Physiology and Behavior from Desert to Sea*, Nova Science Publishers, New York, USA, pp. 407-445.
- Pollo F.E., Salas N.E., Mancini M.A., Martino A.L. (2012) Estudio comparativo de la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares en eritrocitos de tres especies ícticas. *Acta Toxicol. Argent.* 20 (2): 62-67
- Quiroz Herrera V.H., Palacio Baena J. (2017) Niveles sanguíneos de biomarcadores de daño genético en eritrocitos de *Lepidochelys olivacea* (Cheloniidae) en Colombia. *Acta Biol. Colomb.* 22 (3): 322-330
- Reference Ethical Framework for Biomedics Research (REFBR) (2005). Res. N°1047 Anexo II. Ethical principles for research with laboratory, farm and wild animals. CONICET, Buenos Aires, Argentina.
- Richard E., Waller T. (2000) Categorización de las tortugas de Argentina. En Lavilla E.O., Richard E. y Scrocchi G. (Eds.). *Categorización de los Anfibios y Reptiles de Argentina*. Asociación Herpetológica Argentina, Buenos Aires, Argentina pp. 35-44.
- Rojas A.E.C., Saluso J.R. (1987) Informe Climático de la Provincia de Entre Ríos. Publicación Técnica N° 14. Estación Experimental Agropecuaria Paraná - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA-INTA), Paraná, Entre Ríos, Argentina.
- Shaumburg L.G., Poletta G.L., Siroski P.A., Mudry M.D. (2012) Baseline values of Micronuclei and Comet Assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84: 99-103
- Shaumburg L.G., Poletta G.L., Siroski P.A., Mudry M.D. (2014) Spontaneous genetic damage in the tegu lizard (*Tupinambis merianae*): The effect of age. *Mutat. Res.* 766: 5-9
- Shaumburg L.G., Siroski P.A., Poletta G.L., Mudry M.D. (2016) Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. *Pestic. Biochem. Physiol.* 130: 71-78
- Strunjak Perovic I., Lisicic D., Coz Rakovak R., Topic Popovic N., Jardan M., Benkovic V., Tadic Z. (2010) Evaluation of micronucleus and erythrocytic nuclear abnormalities in Balkan whip snake *Hierophis gemonensis*. *Ecotoxicol.* 19: 1460-1465
- Tortato M.A. (2007) Contribuição ao conhecimento de *Phrynops hilarii* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines, Chelidae) em área de restinga no Estado de Santa Catarina, Sul do Brasil. *Biotemas.* 20 (1): 119-122.
- Troiano J.C., Silva M.C. (1998) Valores hematológicos de referencia en tortuga terrestre argentina (*Chelonoidis chilensis chilensis*). *Analect. Vet.* (18): 47-51
- Zapata L.M., Bock B.C., Orozco L.Y., Palacio J.A. (2016) Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 127: 108-116
- Zapata Restrepo L.M., Orozco Jiménez L.Y., Rueda Cardona M., Echavarría S.L., Mena Moreno N., Palacio Baena J.A. (2017) Evaluación genotóxica del agua del Río Grande (Antioquia, Colombia) mediante frecuencia de eritrocitos micronucleados de *Brycon henni* (Characiformes: Characidae). *Rev Biol Trop* 65: 405-414.
- Zuluaga Quintero M., Valencia Ruíz A. M., Ortiz Trujillo I. C. (2009) Efecto genotóxico de contaminantes atmosféricos. *Medicina UPB.* 28: 33-41
- Zúñiga González G., Torres Bugarín O., Luna Aguirre J., González Rodríguez A., Zamora Pérez A., Gómez Meda B.C., Ventura Aguilar A.J., Ramos Ibarra M.L., Ramos Mora A., Ortiz G.G., Gallego Arreola M.P. (2000) Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species mammals, reptiles and birds: Part two. *Mutat. Res.* 467: 99-103
- Zúñiga González G., Torres Bugarín O., Zamora Pérez A., Gómez Meda B.C., Ramos Ibarra M.L., Martínez González S., González Rodríguez A., Luna Aguirre J., Ramos Mora A., Oliveros Lira D., Gallegos Arreola M. P. (2001) Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans: Spontaneous micronuclei in 43 species. *Toxicol. Environ. Mutag.* 494: 161-167

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al CICYTTP-CONICET por los materiales otorgados y el espacio brindado para la realización de las actividades en el laboratorio de herpetología; a la Administración de Parques Nacionales y a la Secretaría de Medio Ambiente de la provincia de Entre Ríos por los permisos otorgados; a Silvia Etcheverry por el apoyo en el laboratorio; a Estefanía Reyes por la ayuda brindada en los muestreos; y a Agustín Bassó por la explicación en la toma de muestras de sangre. Este trabajo fue realizado en parte con financiamiento de PICT 2016-2772 y PIP 389.