

Convocatoria AEET-SIBECOL de ayudas a proyectos de investigación ERC en ecología (9ª ed., 2019)

1. Datos de identificación.

Título de la propuesta	¿Existe variación interpoblacional en el efecto de los fertilizantes sobre la senescencia de la rana común (<i>Pelophylax perezi</i>)?
Categoría	Consolidando la investigación
Nombre y apellidos del Beneficiario	Francisco Javier Zamora Camacho
Datos de contacto: e-mail y teléfono	fj.zamcam@gmail.com/661142649
Departamento/Instituto/Grupo de Investigación/Otros	Departamento de Biodiversidad, Ecología y Evolución Universidad Complutense de Madrid
Dirección, código postal, provincia	C/Tàpies 18, 21450, Cartaya, Huelva.

2. Memoria Técnica. Actividades y resultados de investigación

2.1. Introducción (Planteamiento, objetivos y justificación)

Las poblaciones de anfibios están sufriendo un declive global, entre cuyas causas principales está la contaminación. La supervivencia de muchas poblaciones depende de su capacidad de resistir dicha contaminación, que difiere notablemente entre especies. Entender la capacidad de resistencia a la contaminación de los anfibios es primordial para su conservación.

No obstante, se desconoce el papel de la contaminación sobre aspectos fisiológicos y genéticos fundamentales como el estrés oxidativo y la tasa de acortamiento de los telómeros. El estrés oxidativo puede afectar a la salud de los organismos, mientras que un acortamiento de los telómeros puede acelerar su senescencia. Son conceptos relacionados: el estrés oxidativo puede acortar los telómeros.

En el caso de la rana común (*Pelophylax perezi*), numerosas poblaciones sobreviven en hábitats alterados, mientras que otras prosperan en entornos inalterados. Por tanto, es un modelo idóneo para estudiar adaptaciones a la contaminación.

En este proyecto, se estudiarán los efectos de la exposición crónica al amonio (uno de los contaminantes más abundantes en agrosistemas, y con mayores efectos sobre esta especie) durante las fases de larva y de metamórfico sobre el estrés oxidativo y la longitud de los telómeros de individuos procedentes de ambientes prístinos y agrosistemas, y su relación con el desempeño locomotor.

El amonio podría incrementar el estrés oxidativo, lo que, entre otros efectos nocivos, podría producir un acortamiento de los telómeros, con la consiguiente aceleración de la senescencia. No obstante, las poblaciones expuestas al amonio podrían haber desarrollado mecanismos de resistencia, lo que reduciría el efecto en comparación con poblaciones de hábitats prístinos. Al alterar rutas fisiológicas comunes, el estrés oxidativo y/o el acortamiento de los telómeros podrían perjudicar al desempeño locomotor.

Con este proyecto, se pretende comprobar si existe variación interpoblacional en el efecto del amonio sobre el estrés oxidativo, el acortamiento de los telómeros, el desempeño locomotor, y sus interacciones, en la rana común.

Para ello, se testaron varias hipótesis relacionadas entre sí. En primer lugar, se estudió si los niveles de estrés oxidativo de las larvas y metamórficos de *P. perezi* están relacionados con la longitud de sus telómeros, como consecuencia del presumible efecto del primero acortando los segundos.

Además, se comprobó experimentalmente si una exposición crónica al amonio durante la fase larvaria incrementa el estrés oxidativo y el acortamiento de los telómeros en la propia fase larvaria y justo tras finalizar la metamorfosis, lo que podría tener efectos negativos sobre la salud y la esperanza de vida de los animales.

Por otra parte, se constató si dichos efectos son mayores en ejemplares de hábitats prístinos, sin contaminar, que en otros de agrosistemas, donde el amonio es abundante y los animales pueden estar sometidos a una fuerte presión selectiva que induzca la tolerancia.

Finalmente, se comprobó si los niveles de estrés oxidativo y acortamiento de telómeros tienen un efecto negativo sobre el desempeño locomotor de las larvas y los metamórficos.

2.2. Descripción de la ejecución- Metodología

En primer lugar, se capturaron diez parejas de adultos de hábitats contaminados y otras diez de hábitats prístinos en el término municipal de Cartaya (Huelva). Los animales de cada hábitat fueron acomodados por separado en recintos al aire libre que conforman una planta de experimentación a nivel de mesocosmos en dicha localidad, declarados Núcleo Zoológico por la Junta de Andalucía (Código REGA: ES210210005710). Ambos recintos disponen de estanques artificiales donde las ranas se reprodujeron. Los estanques se revisaron diariamente, y las puestas fueron trasladadas al laboratorio. Allí, los huevos fueron adjudicados aleatoriamente, en grupos de 15, a diferentes acuarios con 6 litros de agua. Se usó un total de 20 acuarios. La mitad de estos acuarios se mantuvo sin tratar, mientras que a la otra mitad se añadió 12 mg/L de amonio, concentración subletal que causa efectos negativos en esta especie. Por tanto, larvas de cada hábitat estuvieron expuestas a cada uno de los tratamientos. El agua se cambió una vez en semana, manteniendo el tratamiento adjudicado, y se alimentó a las larvas *ad libitum* con espinaca hervida.

Cuando los animales alcancen el estadio 40 Gosner, antes de la reorganización morfológica, se fotografió a 100 de ellos para posterior medición con el software ImageJ, se pesaron, y se anotó el tiempo transcurrido desde la eclosión. A continuación, se grabó en vídeo una prueba de natación de cada individuo, cuya velocidad se obtuvo posteriormente con el software Tracker.

El resto de individuos se mantuvieron vivos hasta su metamorfosis. En ese momento, se fotografió a 79 de ellos para posterior medición con el software ImageJ, se pesaron, y se anotó el tiempo transcurrido desde la eclosión. A continuación, se realizó una prueba para conocer la distancia de salto de los animales.

Seguidamente, tanto en el caso de las larvas como de los metamórficos, se procedió a su eutanasia por inmersión en MS-222 según la legalidad vigente. Se seccionó una muestra de tejido muscular de cada individuo (de la cola en el caso de las larvas y de una pata trasera en el caso de los metamórficos), para la medición de la longitud de los telómeros. De esta manera, se evitaron posibles interferencias por diferentes longitudes en los telómeros entre distintos tejidos. El resto de cada muestra se evisceró y se congeló en nitrógeno líquido a -80°C , evitando así toda actividad proteolítica, para estimar el estrés oxidativo.

Del tejido muscular se extrajo ADN genómico y se determinó la longitud de los telómeros mediante PCR cuantitativa (qPCR).

Finalmente, el resto de cada muestra se homogenizó, y se cuantificó mediante técnicas estándar las enzimas antioxidantes catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, y glutatión reductasa en cada individuo. También se cuantificó el malondialdehído formado durante la peroxidación lipídica.

2.3. Resultados obtenidos (cumplimiento de objetivos)

Los marcadores de estrés oxidativo ofrecieron resultados dispares. En primer lugar, la catalasa no fue afectada por el tratamiento, pero sí que disminuyó drásticamente tras la metamorfosis. La glutatión reductasa aumentó después de la metamorfosis solo en los individuos control, aumento que fue inhibido por el amonio. La superóxido dismutasa presentó un patrón similar. La glutatión peroxidasa aumentó en los metamórficos con respecto a las larvas en los animales sujetos a amonio, y también en los individuos control de pinares, pero no en los de agrosistemas, cuyas larvas presentaban unos niveles más altos que todos los demás. El malondialdehído aumentó de la fase larvaria a la de metamórfico, aunque de manera mucho más marcada en los individuos de agrosistemas, que presentaban niveles más bajos durante sus fases larvarias en todos los casos, y más altos en sus fases de metamórficos solo en el grupo experimental, pero no en el control.

En cuanto a la locomoción, la glutatión reductasa presentó un efecto en forma de interacción sobre el tratamiento en larvas: la relación entre la glutatión reductasa y el desempeño locomotor fue positiva en el grupo control pero negativa en el grupo sujeto a amonio. En los metamórficos, la glutatión reductasa presentó en todo caso una relación negativa con la locomoción. También se halló una relación negativa entre la locomoción de los metamórficos y sus niveles de glutatión peroxidasa.

Por lo que respecta al análisis de longitud de telómeros, se halla aún en fase preliminar, pero existen indicios de que el tratamiento causa efectos negativos en la longitud de los telómeros de larvas y metamórficos, relacionados positivamente con los marcadores de estrés oxidativo anteriormente descritos.

2.4. Conclusiones y valoración de la ejecución

Los resultados obtenidos hasta ahora muestran que se cumplen ampliamente las hipótesis de partida. Los distintos marcadores de estrés oxidativo se ven afectados, aunque en medidas variables, por el hábitat de procedencia de los animales, y por el tratamiento con o sin amonio. Además, se observa que en algunos casos hay diferencias entre hábitats aun en ejemplares no sometidos a amonio, lo que sugiere una divergencia, potencialmente

causada por la exposición a contaminación durante generaciones, y que podría desembocar en cierta tolerancia a la misma. Igualmente, y como especial novedad, cabe destacar el efecto observado entre el estrés oxidativo y la locomoción tanto en fases larvarias como postmetamórficas, que hasta la fecha no había sido comprobada. Igualmente, aunque incompletos aún, los análisis que involucran a la longitud de telómeros parecen muy prometedores. Por lo tanto, el proyecto ha sido llevado a cabo con éxito, y los resultados apoyan las predicciones. Estos resultados son de enorme relevancia en los campos de la ecología evolutiva, la ecotoxicología y la conservación de anfibios, entre otros. Esta marcada transversalidad hace de esta investigación una valiosa contribución al avance científico.

2.5. Publicaciones resultantes

Dado que los análisis que involucran a los telómeros no han podido concluirse aún, por el momento no se han publicado estos resultados. Sin embargo, dado el enorme calado de los resultados disponibles, es previsible que el artículo resultante se publique a lo largo del presente año en revistas de alto impacto y de reconocido prestigio internacional, como Trends in Ecology and Evolution, Frontiers in Ecology and the Environment, Global Change Biology o Global Environmental Change.

3. **Informe de gastos del proyecto.** Relación de partidas de gastos y sus importes. Se deberán aportar justificantes originales de los pagos realizados (tickets, recibos o facturas).

Los 3000 euros recibidos fueron empleados en los análisis de estrés oxidativo y de longitud de telómeros por parte de la Estación Biológica de Doñana – Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ver factura adjunta).

Fdo: Francisco Javier Zamora Camacho

en Cartaya, a 27 de enero de 2022