

Convocatoria de ayuda a proyectos de investigación liderados por jóvenes investigadores (9ª ed., 2019)

1. Datos de identificación.

Título de la propuesta	Efectos de la exposición crónica a radiación sobre el envejecimiento celular en anfibios de Chernóbil
Categoría	Ganando independencia
Nombre y apellidos del Beneficiario	Pablo Burraco Gaitán
Datos de contacto: e-mail y teléfono	Pablo.burraco@glasgow.ac.uk - +34647207053
Departamento/Instituto/Grupo de Investigación/Otros	Institute of Biodiversity, Animal Health & Comparative Medicine (University of Glasgow)
Dirección, código postal, provincia	Graham Kerr Building, University of Glasgow – Glasgow G12 8QQ

2. Memoria Técnica. Actividades y resultados de investigación

2.1. Introducción (Planteamiento, objetivos y justificación)

Las condiciones ambientales pasadas definen la historia evolutiva de los organismos. Desafortunadamente, la acción humana suele conllevar cambios ambientales rápidos y a menudo nuevos, lo que limita el desarrollo de respuestas adaptativas. Es lo que generalmente ocurre frente a contaminantes de diversa naturaleza. Un buen ejemplo es la radiación ionizante, la cual es una señal nueva e indetectable, con un gran impacto oxidativo y mutagénico, convirtiéndola en un importante agente selectivo que potencialmente puede favorecer cambios adaptativos. La mayor liberación de radiación ionizante de la historia se produjo tras el accidente en la central nuclear de Chernobyl (1986, ~100 bombas nucleares de Hiroshima y Nagasaki), provocando dramáticos e inmediatos efectos sobre la fauna y flora. Sorprendentemente, tanto la biodiversidad como las densidades poblacionales en la zona han alcanzado niveles similares a los de zonas no contaminadas, favorecido por la ausencia de humanos. Sin embargo, esto no exime a los organismos de pagar posibles costes asociados a los aún altos niveles de radiactividad. En este proyecto he determinado si la radiación actual en Chernóbil acelera el envejecimiento celular en vertebrados. Para ello he usado como sistema de estudio adultos de anfibios, en concreto de la rana arborícola *Hyla orientalis*, muestreados a lo largo de un acentuado gradiente de radiactividad dentro de la zona de Exclusión de Chernóbil.

2.2. Descripción de la ejecución- Metodología

En mayo de 2017 realicé una expedición de dos semanas a la Zona de Exclusión de Chernobyl (Ucrania), junto con el líder del proyecto principal Germán Orizaola (UMIB, CSIC–Universidad de Oviedo, España), Jean-Marc Bonzom (IRSN, Francia) y Sergey Gaschack (Chernobyl Centre, Ucrania). Durante ese periodo recolectamos adultos de la rana arborícola oriental *Hyla orientalis*, en ocho poblaciones distribuidas a lo largo de un gradiente de radiación. En total muestreamos 103 individuos. Para cada individuo cuantificamos la radiación



total absorbida con la ayuda de métodos espectrométricos y radioquímicos y tomamos medidas morfométricas (tamaño, peso...). Además, sabemos la edad de cada individuo, a partir de una técnica conocida como esqueleto-cronología.

Para determinar el estado oxidativo de los individuos, se cuantificó la actividad de cuatro enzimas antioxidantes (glutación reductasa, glutación peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa) así como el nivel de daño oxidativo a nivel de lípidos de la membrana celular (cuantificando los niveles de malondialdehído, un sub-producto de la peroxidación lipídica). todas estas medidas se cuantificaron en muestras de hígado de los individuos. Finalmente se decidió medir una enzima más de las tres que inicialmente se planteó medir en la propuesta enviada a la AEET, de manera que así pudiéramos tener una idea más clara de cómo los individuos están respondiendo a la variación en los niveles de radiación existentes en Chernóbil. En cambio, debido a la falta de muestra para cuantificar valores de glutación, tal y como se planteaba en la propuesta inicial, se decidió prescindir de esta medida. Además, se determinó la concentración de proteína total en cada una de las muestras, ya que las medidas de actividades enzimáticas dependen de este valor. Todas estas determinaciones se basaron en técnicas colorimétricas ampliamente consolidadas en el ámbito de la eco-fisiología de vertebrados. Por otra parte, se cuantificó la longitud de telómeros a través de PCR cuantitativas (qPCRs) en muestras de músculo de una pata trasera. En esta técnica se compara la amplificación de un fragmento de un gen control que no sufre acortamiento con la de un fragmento de la región telomérica. Debido a que los telómeros son necesarios para tener una correcta división celular, y que sabemos que se acortan frente a condiciones estresantes, los telómeros son ampliamente usados como biomarcador de salud de los individuos. Aunque se muestrearon 103 individuos, finalmente se han usado valores de 81 ranas muestreadas en 6 poblaciones diferentes. Esto se debe a que 10 muestras se perdieron durante el traslado de las muestras de un laboratorio a otro por lo que finalmente se decidió no incluir poblaciones de fuera de Chernóbil al no contar con suficiente tamaño de muestra.

2.3. Resultados obtenidos (cumplimiento de objetivos)

Una vez realizados los análisis moleculares tanto de los parámetros de estrés oxidativo como de longitud telomérica (así como de la edad de los individuos), se procedió a analizar los resultados obtenidos. En primer lugar, se llevó a cabo una exploración preliminar de los datos y se descartaron dos medidas de actividades enzimática que tenían entre 2-3 órdenes de magnitud superior al resto. Todas las variables fueron transformadas con logaritmo neperiano para así cumplir con las asunciones paramétricas. Se llevaron a cabo una serie de modelos lineales exploratorios para conocer si, por ejemplo, existían diferencias a nivel poblacional entre las variables cuantificadas:

Physiological parameter	Factor	F-value	Df	P-value
Telomere length	population	3.33	4	0.015
	radiation level	0.02	1	0.878
	age	0.23	1	0.634
	SVL	0.01	1	0.946
Catalase	population	0.72	4	0.583
	radiation level	0.47	1	0.493
	age	6.97	1	0.010
	SVL	0.07	1	0.786



Glutathione reductase	population	2.34	4	0.064
	radiation level	0.12	1	0.732
	age	0.27	1	0.609
	SVL	0.87	1	0.353
Superoxide dismutase	population	2.60	4	0.044
	radiation level	1.62	1	0.207
	age	2.56	1	0.114
	SVL	0.19	1	0.665
Glutathione peroxidase	population	3.11	4	0.020
	radiation level	8.32	1	0.005
	age	0.15	1	0.704
	SVL	0.07	1	0.786
Lipid peroxidation	population	1.36	4	0.258
	radiation level	20.99	1	< 0.001
	age	21.24	1	< 0.001
	SVL	0.137	1	0.713

En todos los modelos se incluyó la edad (age) y la longitud hocico-cloaca (SVL) de cada individuo como medidas correctoras que podrían explicar la variación observada en variables fisiológicas, ya sea entre poblaciones o en respuesta a la variable de interés (niveles de radiación).

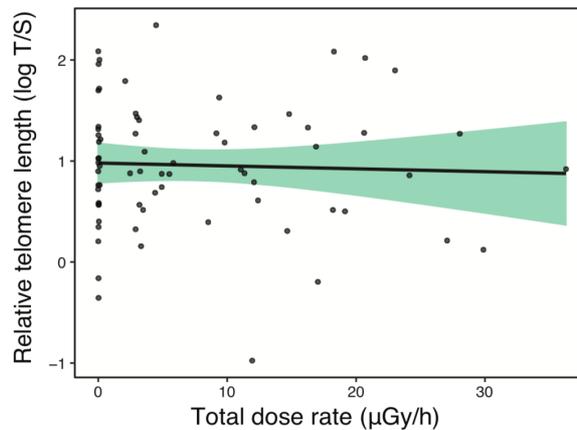
Tras la primera exploración de los datos, y conocer la naturaleza de los mismos, se llevaron a cabo modelos denominados “mixtos” en los que, además de cada una de las variables fisiológicas medidas y de la radiación absorbida (total dose rate), se incluyó “población” como factor “aleatorio”, así como la edad y la longitud hocico-cloaca.

Physiological parameter	Factor	Chi-sq	Df	P-value
Telomere length	total dose rate	0.17	1	0.682
	age	0.01	1	0.993
	SVL	0.16	1	0.691
Catalase	total dose rate	0.20	1	0.653
	age	1.57	1	0.211
	SVL	0.19	1	0.661
Glutathione reductase	total dose rate	0.07	1	0.792
	age	0.25	1	0.614
	SVL	1.57	1	0.210
Superoxide dismutase	total dose rate	0.77	1	0.379
	age	0.70	1	0.401
	SVL	0.28	1	0.595
	total dose rate	4.78	1	0.029

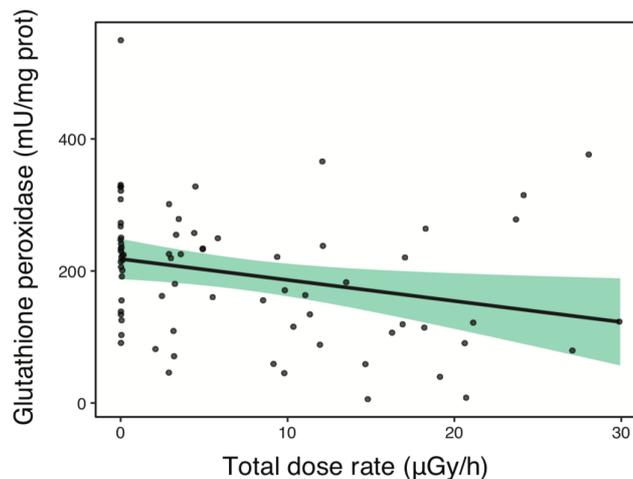


Glutathione peroxidase	age	0.86	1	0.354
	SVL	0.34	1	0.560
	total dose rate	3.99	1	0.046
Lipid peroxidation	age	22.78	1	< 0.001
	SVL	0.17	1	0.680

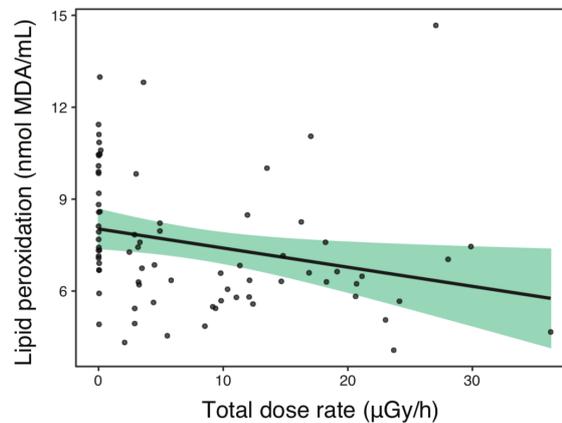
De la anterior tabla se desprende, por ejemplo, que la longitud telomérica no se ve afectada por la exposición a niveles más altos de radiación. En la siguiente figura se puede apreciar la ausencia de correlación entre ambas variables continuas.



De manera similar al patrón observado para los valores de longitud de telómeros, los niveles de tres enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa) no presentaron una correlación significativa frente a los niveles de radiación de cada individuo. En cambio, encontramos una correlación negativa entre glutatión peroxidasa -su principal función es la de catalizar la reacción de oxidación del glutatión a glutatión disulfuro, usando para ello peróxido de hidrógeno- frente a los niveles de radiación absorbida (estimate = -12.68).



Un patrón similar encontramos entre los niveles de MDA -marcador de peroxidación lipídica- y la radiación absorbida por los individuos a lo largo del grado de radiación de la Zona de Exclusión de Chernóbil (estimate = -0.15).



2.4. Conclusiones y valoración de la ejecución

La principal conclusión que se deriva de los resultados obtenidos en este proyecto es que los niveles actuales de radiación que se encuentran en Chernóbil no parecen afectar a uno de los principales marcadores de envejecimiento celular, como es la longitud de telómeros. En cambio, la exposición a distintos niveles de radiación afectó a marcadores ligados al balance oxidativo de los individuos. Estos resultados contrastan con los esperados ya que encontramos que los niveles de actividad antioxidante de la enzima glutatión peroxidasa es menor en individuos con mayores niveles de radiación y, además, niveles más altos de radiación correlacionan con un menor daño a nivel de los lípidos de la membrana celular. Aunque sorprendentes, estos resultados podrían indicar una respuesta adaptativa a altos niveles de radiación (similar a lo observado en otras especies, como por ejemplo en aves; Moller & Mousseau in TREE 2016). Alternativamente, estos individuos podrían estar severamente afectados de manera que estos resultados indicarían un menor metabolismo asociado a toxicidad. Sin embargo, esta explicación alternativa es poco plausible ya que todos los individuos que se muestrearon fueron machos de *Hyla orientalis* que estaban cantando activamente durante la temporada de reproducción, por lo que se asume que su condición corporal era, cuanto menos, aceptable. Otros factores como el tamaño o la edad de los individuos, podrían explicar estos resultados, sin embargo, estos factores fueron incluidos en los análisis finales.

Estos resultados abren aún más el debate ya existente acerca de los efectos que la radiación presente actualmente en Chernóbil tiene sobre las poblaciones salvajes que allí habitan. En concreto, estos resultados aumentan el conocimiento que durante los últimos años hemos ido adquiriendo sobre el estado en el que se encuentran las poblaciones de esta rana arborícola en Chernóbil. De hecho, los resultados aquí mostrados deberán ser correlacionados con el resto de información con la que contamos para esos mismos individuos, como por ejemplo los niveles de respuesta inmune o la coloración de la piel. Respecto a esta última variable, sabemos que las ranas de dentro de la Zona de Exclusión son más oscuras que las que se encuentran en zonas adyacentes pero que no estuvieron sometidas a una exposición tan abrupta a radiación durante los momentos inmediatamente posteriores al accidente nuclear. Debemos estudiar, por tanto, si la coloración de las ranas explica algunos de los cambios

observados en los niveles de enzimas antioxidantes y daño lipídico que hemos encontrado en este estudio. A pesar de que aún quedan muchas preguntas por resolver, los datos aquí recogidos ayudan en gran medida a entender el impacto que la exposición crónica a radiación puede tener sobre la fisiología ligada al envejecimiento y metabolismo celular en vertebrados.

2.5. Publicaciones resultantes

Los resultados obtenidos en este proyecto han sido obtenidos y analizados recientemente por lo que aún no se ha generado una publicación científica. Ahora que ya disponemos de una idea bastante precisa de los patrones observados, se va a comenzar la fase de redacción del manuscrito. Esperamos que este manuscrito sea publicado en una revista internacional de prestigio. La contribución de este proyecto financiado por la AEET, esencial para conseguir esta información, será claramente detallada en los agradecimientos de dicha publicación, y la AEET será informada cuando esto ocurra. El principal motivo de dicho retraso se debe a la actual pandemia. Debido a la crisis motivada por el coronavirus, los laboratorios estuvieron cerrados durante meses y el envío de las muestras se vio ralentizado. Además, como en la mayoría de los casos, esto también implicó complicaciones a nivel personal dentro del equipo de investigación.

Sin embargo, y aunque todavía no se han publicado los resultados en una revista científica, he tenido la oportunidad de divulgar las principales ideas de este proyecto en el blog de la AEET. Este contenido fue publicado recientemente (2 de febrero de 2021) y puede ser consultado en la siguiente dirección web:

<https://blogaeet.org/2021/02/02/chernobil-refugio-para-la-fauna-y-fuente-de-envejecimiento/>

Finalmente, tal y como se indica en el siguiente apartado, se espera diseminar los resultados aquí obtenidos en un congreso nacional o internacional.

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).

Se adjuntan dos facturas ligadas a los gastos derivados por el presente proyecto. La primera (1122 euros) se corresponde con la extracción de DNA y el procesado/envío de muestras (Chornobyl Center). La segunda (1200 euros) se corresponde con los análisis de longitud telomérica y de los marcadores de estrés oxidativo realizados por el laboratorio de Ecofisiología de la Estación Biológica de Doñana. Solicito autorización a la AEET para disponer del montante restante para diseminar los resultados aquí obtenidos en un congreso nacional o internacional.



РАХУНОК-ФАКТУРА №1	INVOICE No. 1
Бенефіціар: Чорнобильський центр з проблем ядерної безпеки, радіоактивних відходів та радіоекології	Beneficiary: Chernobyl Center for Nuclear Safety, Radioactive Waste and Radioecology
Адреса: вул. 77ої Гвардійської дивізії 11, Славутич, Київська обл., Україна, 07101	Address: 11, 77 Gvardeyskaya Diviziya str., Slavutich, Kiev region, Ukraine, 07101
Банк Бенефіціару: АТ «ОЩАДБАНК» Чернігів, Україна (10024/0308) IBAN UA16353530000026002300007764 СВІФТ/ВІС: COSBUAUK Acc. 4008865941\01 Банк Кореспондент: COMMERZBANK AG, Франкфурт на Майні СВІФТ: COBADEFF	Beneficiary Bank: JSC OSCHADBANK Ukraine, Chernigiv (10024/0308) IBAN UA16353530000026002300007764 SWIFT CODE/BIC: COSBUAUK Acc. 4008865941\01 Correspondent Bank: COMMERZBANK AG, FRANKFURT am MAIN SWIFT CODE: COBADEFF
Дата: 7 червня 2020 р.	Date: June 07, 2020
Замовник: Pablo Burraco Інститут біорізноманіття Здоров'я тварин та порівняльна медицина університет Глазго Будівля Грехема Керра G12 8QQ Глазго, Шотландія	Client: Pablo Burraco Institute of Biodiversity Animal Health & Comparative Medicine Glasgow University Graham Kerr Building G12 8QQ Glasgow, Scotland

№ п/п	Виконані роботи	Вартість (EUR)	Item No.	Accomplishments	Cost (EUR)
1	Вилучення ДНК та підготовка зразків (набори та лабораторні роботи) 120 зразків	850	1	DNA extraction and sample preparation (kits and laboratory work) 120 samples	850
	Накладні витрати (32%)	272,00		Overhead (32%)	272,00
	РАЗОМ	1122,00		TOTAL	1122,00

РАЗОМ ДО ОПЛАТИ:	EUR	TOTAL AMOUNT DUE:	EUR
------------------	------------	-------------------	------------

Михаил Бондарьков генеральный директор / Mikhail Bondarkov Director General



MINISTERIO
DE CIENCIA, INNOVACIÓN
Y UNIVERSIDADES



PRESTACIÓN DE SERVICIO

DATOS DEL SOLICITANTE

Nombre o razón social de la entidad: Pablo Burraco Gaitán

Domicilio: ½ 11 Nairn St Glasgow

N.I.F.: ██████████

DATOS DE LA PRESTACIÓN DE SERVICIO

Centro/Instituto: ESTACION BIOLÓGICA DE DOÑANA

Objeto: Análisis de parámetros de estrés oxidativo y medidas de tamaño relativo de telómeros

Investigador responsable: Jordi Figuerola

Departamento: Laboratorio de Ecofisiología

Importe: 1200,75 euros (iva incluido)

En Sevilla, a día 2 de Febrero de 2021

POR EL CSIC: (firmas y sello)



 Nombre Nombre
 Jordi Figuerola Director del Centro/Instituto
 Investigador Principal

POR LA ENTIDAD SOLICITANTE: (firma y sello)

Nombre
Cargo:

Fdo: Pablo Burraco



en Glasgow a 4 de marzo de 2021