CEMarin
Newsletter
Corporation Center of Excellence in Marine Sciences

Explorando las poblaciones de peces a través de los otolitos: el caso de la cojinúa negra y el lebranche.

Joven investigador CEMarin: Johan Sebastián Villarraga Jiménez
Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Colombia
Director e Investigador CEMarin: Dr. Camilo Bernardo García

El Caribe colombiano ha sido testigo de una relación estrecha entre las comunidades costeras y los recursos marinos a lo largo de la historia. La pesca artesanal y su conocimiento transmitido de generación en generación, ha sido el sustento de muchos pobladores. En medio de esta dinámica, especies como la cojinúa negra y el lebranche emergen como protagonistas en una historia que entrelaza la pesca local con su aprovechamiento comercial. Sin embargo, a medida que las poblaciones humanas han crecido y las tecnologías de pesca han avanzado, la presión antrópica sobre las poblaciones de peces ha aumentado considerablemente.

La pesca intensiva combinada con la degradación de los hábitats marinos debido a la contaminación y el cambio climático ha ejercido una presión significativa sobre estas especies, poniendo en riesgo su sostenibilidad a largo plazo. Adicionalmente, el desconocimiento sobre las dinámicas de las poblaciones y los ecosistemas acuáticos puede tener consecuencias desalentadoras para la pesca artesanal. La falta de información precisa sobre la biología y el comportamiento de las especies puede tener efectos irreversibles sobre la biodiversidad marina.

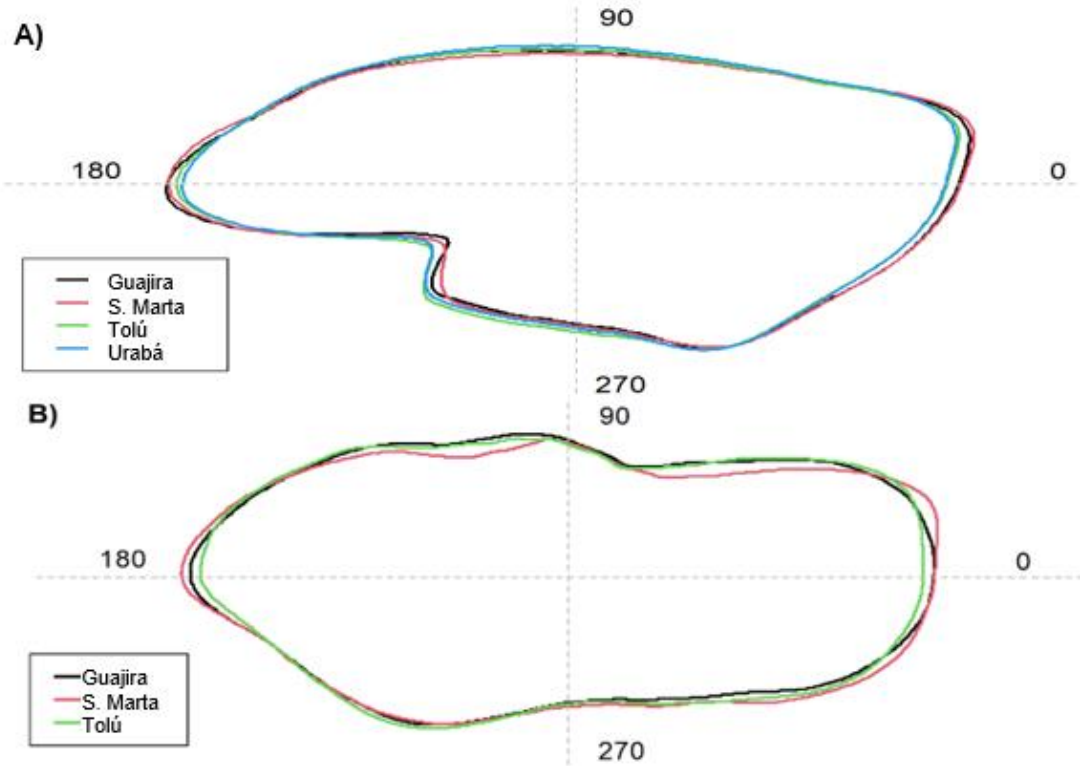
Sin embargo, con el afán de comprender los ecosistemas y organismos marinos, han surgido nuevas técnicas que permiten explorar la historia y las dinámicas de las poblaciones acuáticas. Una de estas estrategias revolucionarias involucra el análisis de los otolitos, que son pequeñas estructuras calcáreas en los oídos internos de los peces, asociadas a la audición y equilibrio de los individuos. En el Caribe colombiano estas técnicas no han sido aplicadas, por lo que resultan innovadoras a la hora de comprender las dinámicas de las especies en nuestro país. Por lo tanto, este estudio tuvo como principal pregunta de investigación: ¿existen diferentes poblaciones de lebranche y cojinúa negra en el Caribe colombiano?, y para responder esto, se usó la morfología del contorno de los otolitos.

La primera parte de este proyecto se llevó a cabo en cuatro localidades del Caribe colombiano (Urabá, Tolú, Santa Marta y La Guajira) en donde se colectaron los individuos de las dos especies. Posteriormente, a cada individuo se le extrajo tanto otolito derecho como izquierdo para la toma de fotografías en un estereoscopio. Para comparar la variación de las medidas de los otolitos entre los sitios, se utilizó una variedad de pruebas que incluyeron: el análisis de varianza ANOVA, PERMANOVA, el algoritmo VARSEDIG, el Random forest, la regresión logística multinomial y, en particular para la morfología, los análisis de Fourier y de Wavelet. Se resalta que en general los resultados fueron consistentes y coherentes, indicando la existencia de dos stocks diferenciables de cojinúa, uno al norte (Santa Marta, Guajira) y otro al sur (Tolú, Urabá), sin que se pueda descartar la posibilidad de stocks diferentes en cada localidad. En el caso del lebranche se determinaron tres stocks diferenciables, sin descartar la posibilidad de un solo stock en el norte. Para el lebranche esta distribución podría estar ligada a su ciclo e historia de vida, rasgos que pueden promover el aislamiento geográfico. Para la cojinúa los stocks identificados podrían estar ligados más bien a factores oceanográficos del Caribe colombiano, y en particular, la interacción dinámica entre la contracorriente Panamá-Colombia en el sur y el fenómeno de surgencia en el norte.

Finalmente, el contorno y la morfología de los otolitos demostró ser una fuente de información invaluable para confirmar la existencia de poblaciones distintas de cojinúa negra y lebranche en las aguas del Caribe colombiano. Estas pequeñas estructuras exhiben variaciones únicas en su forma y tamaño, lo que sugiere diferencias genéticas y ambientales entre las poblaciones. A través del análisis detallado de la forma, el tamaño y las características específicas de los otolitos de individuos capturados en diversas áreas, se ha revelado la existencia de grupos diferenciados de cojinúa negra y lebranche, destacando la importancia de considerar estas poblaciones únicas al abordar estrategias de conservación y gestión de recursos marinos en la región.

Una Mirada al Futuro

La combinación de técnicas científicas y la comprensión de las poblaciones de peces en el Caribe colombiano ofrecen perspectivas valiosas para el futuro. La discriminación de poblaciones mediante el análisis de otolitos puede contribuir a la formulación de políticas de manejo pesquero y la protección de los ecosistemas marinos. Además, esta investigación subraya la importancia de mantener un equilibrio entre el aprovechamiento sostenible de los recursos marinos y la preservación de la biodiversidad. En última instancia, el estudio de los otolitos en peces como la cojinúa negra y el lebranche muestra cómo los avances científicos pueden dar aproximaciones valiosas. A medida que continuemos explorando y comprendiendo los océanos, también debemos recordar la responsabilidad compartida de conservar y proteger estos entornos para las generaciones venideras.



*Forma media de otolitos basada en la reconstrucción de Wavelet **A)** cojinúa **B)** lebranche*

Otolitos de cojinúa (izquierda) y lebranche (derecha) con el sulcus apuntando hacia abajo

Joven investigador Johan Villarraga fotografiando los otolitos.

CEMarin Newsletter

Corporation Center of Excellence in Marine Sciences

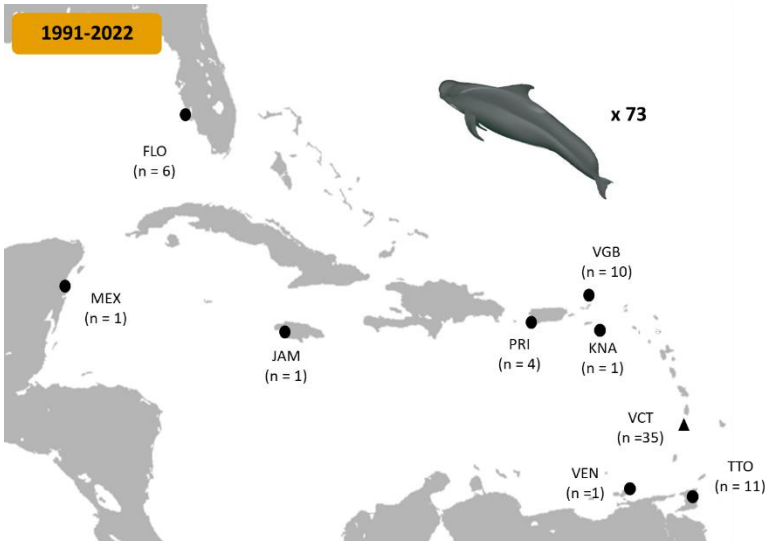
Un acercamiento al estado de conservación actual de las ballenas piloto de aleta corta en el Caribe

Joven investigador CEMarin: Nicolás Restrepo Garzón
Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes
Director e Investigador CEMarin: Dra. Susana Caballero Gaitán

Las ballenas piloto de aleta corta (*Globicephala macrorhynchus*) son conocidas por formar grupos familiares complejos, en donde las crías permanecen con la madre por varias generaciones o el resto de su vida (lo que se conoce como una estructura social matrilineal estricta). Como muchos grandes mamíferos del océano, son una especie longeva, que depende de sus migraciones para encontrar otros grupos familiares con los cuales procrear y mantener una diversidad genética saludable para la especie.

Aunque las ballenas piloto de aleta corta no están catalogadas como especie en peligro de extinción, son escasos los estudios sobre su estado de conservación actual en el Caribe. Su estructura matrilineal compleja sumada al hecho que son animales migratorios y presentan fidelidad a sitios específicos por largos periodos de tiempo la hacen una especie vulnerable a la caza, la destrucción del hábitat y la contaminación, amenazas que pueden aislar grupos familiares enteros, detener migraciones y evitar el intercambio genético entre individuos. Razones de peso para creer que su situación real puede ser mucho más desesperanzadora.

Rastrear los grupos familiares y sus migraciones es sumamente difícil al ser una especie principalmente oceánica, que alcanza bajas profundidades. Por eso se realizó este estudio genético con muestras de tejido de 72 individuos encontrados de manera oportunista, tanto de animales varados en la costa como de aquellos capturados para consumo (en el caso de San Vicente y las Granadinas), en algunos puntos del mar Caribe entre 1999-2022 por la Red Caribeña de Varamientos, la Red de Varamientos de Mamíferos Marinos de Quintana Roo (RVMMQROO) y Florida International University. Un estudio que, gracias a las nuevas tecnologías genéticas, nos permite entender mejor qué ocurre con las poblaciones de estos animales poco conspicuos.



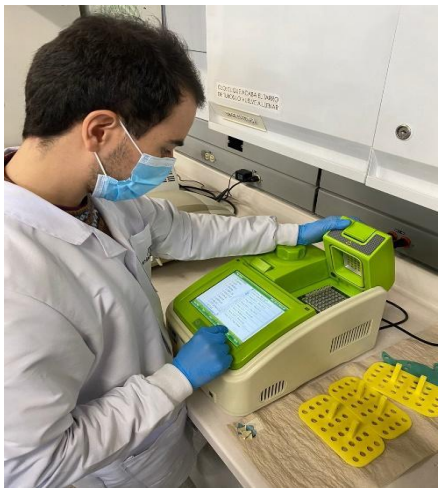
Muestras de tejido colectadas de *G. macrorhynchus* entre 1991.2022 en el Caribe: JAM = Jamaica, MEX = México, PRI = Puerto Rico, TTO = Trinidad y Tobago, VCT = San Vincente y las Granadinas, VEN = Venezuela, VGB = Islas Vírgenes Británicas, FLO = Florida y KNA = San Cristóbal y Nieves.

Estudiando el ADN para desvelar los secretos de sus poblaciones

Gracias a la nueva tecnología de alto rendimiento llamada Secuenciación de ADN Asociada a Sitios de Restricción (RADseq), se pudieron identificar miles de marcadores moleculares como los Polimorfismos de Nucleótido Único (SNP) de pocos individuos en una sola ejecución y sin necesidad de analizar todo el genoma. Además, se analizaron más simultáneamente, agilizando el análisis genético de las 72 muestras, logrando mejores resultados que con otros marcadores.

Los datos obtenidos de cada individuo permitieron hacer un análisis de estructura genética más robusto que logró identificar tres grupos poblacionales diferenciados en todo el Caribe, representados como unidades de manejo (UM). Dos de estas UM resultaron ser exclusivas al archipiélago de San Vicente y las Granadinas (SVG), sugiriendo poblaciones residentes locales. La tercera UM presentó una distribución en todas las localidades, con una menor diversidad genética y un flujo génico restringido característico de las poblaciones potencialmente transitorias u oceánicas.

Además de los análisis de SNPs, también se analizó el ADN mitocondrial para obtener información de la línea maternal. La secuenciación de la Región de Control del mtDNA reveló la presencia de nueve nuevos haplotipos exclusivos en la región del Caribe, sugiriendo una diversidad genética aún mayor de la que se pensaba.



Proceso de extracción de ADN y PCR para la amplificación de ADN mitocondrial de las muestras de ballenas piloto de aleta corta. Fotografía: Laura Baldrich.

Importancia para la conservación y acciones futuras

Este estudio representa un paso importante hacia la conservación de las ballenas piloto de aleta corta en el Caribe. Aunque nuestros resultados actuales no indican una situación alarmante en cuanto a la diversidad y demografía de las poblaciones del Caribe, sí proporciona una base crucial para futuras investigaciones sobre la vulnerabilidad y las amenazas a las que se enfrentan estas poblaciones en la región. Este emocionante hallazgo científico arroja nueva luz sobre esta especie y destaca la importancia de una investigación continua para evaluar la vulnerabilidad y las amenazas en curso que puedan afectar a estas poblaciones. La comprensión de la estructura de la población y la diversidad genética son esenciales para el desarrollo de estrategias de conservación efectivas.

El Caribe sigue siendo un misterio que merece ser explorado y protegido. Nuestro viaje continúa en busca de un mayor entendimiento y preservación de estas increíbles criaturas marinas, en un esfuerzo por asegurar que sigan siendo un tesoro del mar Caribe por generaciones venideras.

CEMarin Newsletter

Corporation Center of Excellence in Marine Sciences

Descubriendo los misterios de los mamíferos acuáticos: un viaje a través de la investigación del cultivo celular en Colombia.

Joven investigador CEMarin: Laura Mercedes Baldrich Mora
Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes
Director e Investigador CEMarin: Dra. Susana Caballero Gaitán

Colombia es un país megadiverso que alberga al menos el 10% de la biodiversidad del mundo (SiB, 2020). El país cuenta con la presencia de 41 especies de mamíferos acuáticos, incluidas ballenas, manatíes, delfines marinos y de agua dulce, entre otros. Sin embargo, al menos 12 de estas especies están registradas bajo alguna categoría de peligro, lo que resalta la necesidad de comprender mejor su ecología como insumo para el desarrollo de planes de conservación efectivos. Si bien hemos podido aprender sobre el hábitat, distribución, abundancia, comportamiento e interacciones de estos organismos con actividades antropogénicas (Trujillo et al., 2013), todavía queda mucho por aprender, especialmente en estudios moleculares y fisiológicos que requieren más muestreo invasivo. El estudio de los mamíferos marinos representa un enorme desafío debido a su gran tamaño, las escasas oportunidades de financiación, la dificultad para acceder a sus hábitats y la compleja logística necesaria para superar estas barreras y lograr muestras de alta calidad.

Un enfoque innovador para superar las barreras presentes en nuestra capacidad de realizar investigaciones profundas sobre estas criaturas acuáticas en Colombia puede ser la creación de bancos de cultivos celulares. Esta técnica consiste en obtener células viables a partir de muestras de tejido, cultivarlas en un entorno artificial favorable y, posteriormente, almacenarlas en condiciones de congelación adecuadas para su uso futuro. El cultivo celular y la criopreservación de muestras de tejido y sangre permiten preservar las funciones e información innatas de un organismo durante un largo período (Boroda, 2017; Houck et al., 2017). Una vez aislados y almacenados adecuadamente, estos cultivos pueden usarse como sistemas modelo de tejidos, órganos o incluso animales enteros para una cantidad casi ilimitada de pruebas, que pueden realizarse siempre que sea necesario y en condiciones muy precisas y controladas (Boroda, 2017; Yajing et otros, 2018). Por lo tanto, los cultivos de células de mamíferos acuáticos pueden convertirse en una herramienta multifuncional de conservación ex situ, ya que nos permiten realizar estudios fisiológicos, bioquímicos, genéticos y ecotoxicológicos sin el uso de animales completos (Boroda et al., 2020).

La implementación de bancos de cultivos celulares de mamíferos acuáticos en Colombia representa una gran oportunidad para mejorar la investigación y conservación de los mamíferos acuáticos en el país y contribuiría a un esfuerzo global hacia este fin, con la generación de investigación de alta calidad en el área. En este sentido, nuestro estudio tuvo como objetivo proponer una metodología para el establecimiento de cultivos celulares de mamíferos acuáticos colombianos adecuada para futuros estudios. La metodología propuesta incluyó la recolección de muestras, su transporte, el procesamiento de muestras y la criopreservación de tejidos, y se implementó en muestras de piel de cuatro especies: delfines de río Amazonas (*Inia geoffrensis*), el manatí amazónico (*Trichechus inunguis*), las ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*) y una rata de laboratorio Wistar (*Ratus norvegicus*); este último se utilizó como tejido de mamífero de más fácil acceso para practicar el procedimiento. Las muestras fueron transportadas desde cada localidad para ser procesadas en el laboratorio de cultivo celular

del Grupo de Investigación en Genética Humana de la Universidad de Los Andes. Las biopsias de piel limpia se dividieron en dos grupos: un grupo se congeló en nitrógeno líquido para criopreservación y el otro se procesó para obtener el cultivo celular.

Pudimos observar fibroblastos adheridos (células del tejido conectivo) en los cultivos celulares establecidos en los delfines de río y en las ratas. Sin embargo, en ninguno de los casos se alcanzó el crecimiento celular inicial necesario (es decir, confluencia) para utilizar los cultivos para otras pruebas. Los fragmentos de tejido de todas las especies muestreadas se criopreservaron para intentar el posterior inicio de cultivos primarios; la unión celular exitosa se produjo sólo con los fragmentos recuperados de la ballena jorobada. Además, con base en los resultados iniciales y una investigación continua de la literatura, se realizaron modificaciones a la metodología en la sección de procesamiento de muestras y establecimiento de cultivos de tejidos. La metodología modificada se probó con muestras de delfines de río y se observaron fibroblastos en forma de huso desde los siete días de cultivo, pero no se pudo alcanzar la confluencia debido a la constante contaminación. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio en Colombia que intenta el establecimiento de cultivos de células primarias de fibroblastos de *T. inunguis* e *I. geoffrensis*.

Se necesita más investigación para identificar otros posibles factores que puedan haber influido en el desarrollo de los cultivos celulares de los mamíferos acuáticos muestreados en este estudio. Estos factores incluyen características epidérmicas de la piel (textura, espesor, porosidad), condiciones ambientales en el sitio de muestreo, cambio de altitud entre el sitio de muestreo y el sitio de procesamiento de muestras, entre otros mencionados anteriormente. Comprender los efectos de estas variables puede resultar en el establecimiento exitoso de cultivos celulares primarios que logren la confluencia necesaria para permitirnos determinar la tasa de crecimiento, verificar la contaminación cruzada, confirmar el tipo de célula (fibroblastos) y autenticar genéticamente el cultivo. Estas pruebas son necesarias para poder utilizar estos cultivos en futuros estudios, incluyendo su respuesta inmune y fisiológica, producción de proteínas y respuesta toxicológica, entre muchos otros, aportando evidencia que apoye la conservación de diferentes especies de mamíferos acuáticos colombianos.

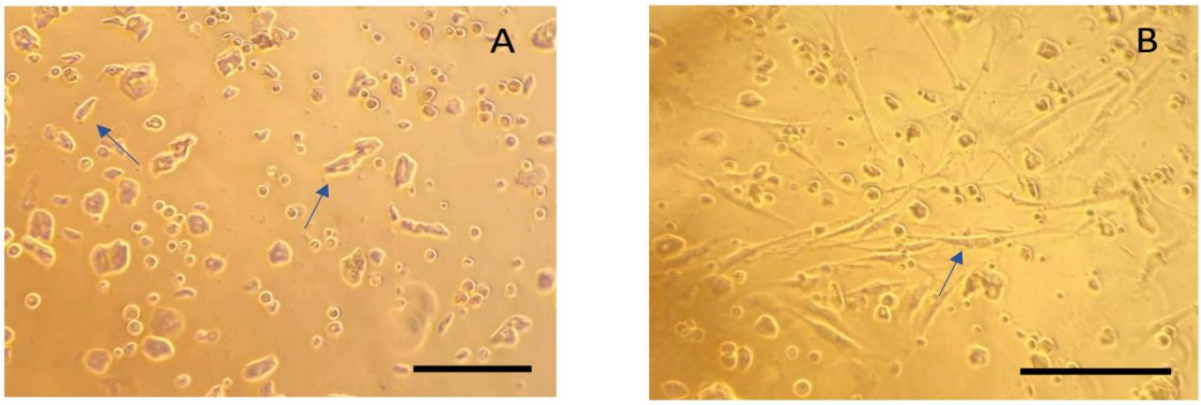


Figura 1. *Establecimiento de cultivo celular primario con la metodología modificada de una muestra de delfín del río Amazonas. Al tercer día de cultivo, muestra muchas células desagregadas y algunas han comenzado a alargarse (B). Se observaron fibroblastos adheridos al séptimo día de cultivo. Las células que se alargan se señalan con una flecha azul. La barra de escala representa 250 µm.*

Figura 2. *Fragmentos de biopsia de cola de delfín del río Amazonas utilizados para el establecimiento del cultivo celular primario. Las muestras fueron donadas por la Fundación Omacha.*

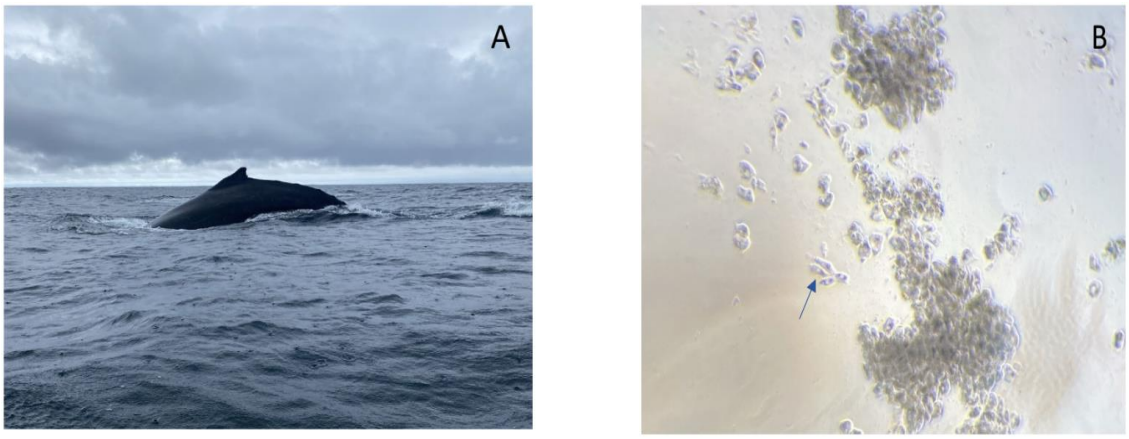


Figura 3. *La ballena jorobada muestreada para cultivo celular en octubre de 2021 (A). Cultivo celular el día 12, que muestra células de fibroblastos alargadas (B). Las células que se alargan se señalan con una flecha azul.*

Referencias

Baldrich Mora, L. (2022). *The Ins and Outs of Aquatic Mammal Tissue Culture Establishment for Colombian Species. A First-Time Approach.* Universidad de los Andes. https://repositorio.uniandes.edu.co/handle/1992/64400

Boroda, A. V. (2017). Marine mammal cell cultures: To obtain, to apply, and to preserve. *Marine Environmental Research*, *129*, 316–328. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.06.018

Boroda, A. V., Kipryushina, Y. O., Golochvastova, R. V., Shevchenko, O. G., Shulgina, M. A., Efimova, K. V., Katin, I. O., & Maiorova, M. A. (2020). Isolation, characterization, and ecotoxicological application of marine mammal skin fibroblast cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, *56*(9), 744–759. https://doi.org/10.1007/s11626-020-00506-w

Houck, M. L., Lear, T. L., & Charter, S. J. (2017). Animal cytogenetics. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*, 1055–1102. https://doi.org/10.1002/9781119061199.ch24

SiB, S. de información sobre B. en C. (2020). *Biodiversidad en cifras*. https://cifras.biodiversidad.co/

Trujillo, F., Gärtner, A., Caicedo, D., & Diazgranados, Ma. C. (2013). Diagnóstico del estado de conocimiento y conservación de los mamíferos acuáticos en Colombia. *MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE* (Vol. 1, Issue 3). http://marefateadyan.nashriyat.ir/node/

Yajing, S., Rajput, I. R., Ying, H., Fei, Y., Sanganyado, E., Ping, L., Jingzhen, W., & Wenhua, L. (2018). Establishment and characterization of pygmy killer whale (Feresa atenuata) dermal fibroblast cell line. *PLoS ONE*, *13*(3), 1–15. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195128