

Evaluación de genotoxicidad de formulaciones plaguicidas y mezclas en *Caiman latirostris*.

López González EC.^{1,2}, Larriera A.¹, Siroski PA.^{1,2,3}, Poletta GL.^{1,2,4}

¹”Proyecto Yacaré” - Lab. Zoología Aplicada: Anexo Vertebrados (FHUC-UNL/MASPyMA). Av. Aristóbulo del Valle 8700 (3000), Santa Fe, Argentina. ²CONICET. Av Rivadavia 1917 (C1033AAJ), CABA, Argentina. ³Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina. ⁴Cát. Toxicol. y Bioq. Legal, FBCB-UNL. Ciudad Universitaria - Paraje El Pozo S/N (3000), Santa Fe, Argentina.

evelynclg@hotmail.com

Título del proyecto: “Evaluación de mecanismos de toxicidad de plaguicidas de amplio uso agrícola en *Caiman latirostris* (yacaré overo), mediante biomarcadores de genotoxicidad, inmunotoxicidad y estrés oxidativo”. Director: Dra. Gisela Poletta. Universidad Nacional del Litoral. Convocatoria CAI+D 2011. Cód: 50120110100189.

Caiman latirostris (Yacaré overo) es una de las dos especies del género *Caiman* (Crocodylia, Alligatoridae) que habitan en Argentina¹. Como resultado de la expansión agrícola producida en los últimos años, muchas poblaciones naturales quedaron expuestas a continuas descargas de plaguicidas, principalmente debido a su existencia en ambientes naturales fragmentados.

Los marcadores de genotoxicidad son indicadores tempranos de daño al material genético y/o estructuras asociadas. Entre ellos, los Micronúcleos (MN) constituyen fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros rezagados durante la división celular, como consecuencia de eventos clastogénicos o aneugénicos, respectivamente, producidos por la acción de diferentes agentes². Los mecanismos de formación de las anormalidades nucleares (AN) todavía no están completamente estudiados, pero también se consideran marcadores de la acción de agentes genotóxicos^{3,4}.

El objetivo de este estudio fue evaluar, bajo condiciones experimentales y en distintas etapas del desarrollo de *C. latirostris*, la genotoxicidad producida por formulaciones comerciales de insecticidas: Endosulfan (END; Galgofan®- 35%) y Cipermetrina (CIP Atanor®- 25%), de un herbicida: Glifosato (GLI; Roundup® Full II- 66.2%), y de la mezcla (M) de formulaciones: glifosato + cipermetrina + endosulfán, para determinar si existe interacción entre estas formulaciones.

Se realizaron dos tipos de experimentos: exposición embrionaria y exposición de crías. Se utilizaron huevos o neonatos provenientes de distintos nidos cosechados en una zona situada a más de 20 km de cualquier actividad contaminante, la Reserva Natural Manejada “El Fisco” (30° 11’ 26” S; 61° 0’ 27” W; Dpto. San Cristóbal, Santa Fe, Argentina), bajo el programa de rancheo: ‘Proyecto Yacaré’. Los estudios se llevaron a cabo en el Laboratorio de Zool. Aplicada: Anexo Vertebrados “Proyecto Yacaré” (FHUC-UNL / MASPyMA).

Para las exposiciones embrionarias (*in ovo*), los huevos fueron distribuidos al azar y en forma equitativa en 13 grupos experimentales de 10 huevos cada uno (N= 130): un grupo control negativo (CN), sin exposición al contaminante, tratado con agua destilada (50 µl); 4 grupos expuestos a distintas concentraciones de END y CIP (1, 10, 100 y 1000 µg/ huevo), utilizando en éstos casos etanol como control de vehículo (CV- 50 µl); y 3 grupos expuestos a distintas concentraciones de GLI (500, 750 y 1000 µg/huevo). Los huevos fueron topicados por única vez al inicio de la incubación y

luego mantenidos bajo condiciones controladas a $31,5 \pm 0,5$ °C y humedad del 95%. Una vez nacidos los neonatos, se les extrajo sangre periférica y se aplicaron los biomarcadores de genotoxicidad planteados para este trabajo.

Para la exposición de crías (*in vivo*), los ejemplares de 10 - 15 días de edad se distribuyeron al azar en 7 grupos experimentales de 15 animales cada uno (N= 105): un CN, un CV (etanol), dos grupos expuestos a formulaciones de END, dos a CIP, y la M.

La exposición se realizó por inmersión voluntaria a concentraciones sub-letales, durante un período de dos meses, con disminución progresiva de la concentración de los compuestos, teniendo en cuenta la cinética de degradación de los mismos en agua, previamente determinada por HPLC. Así, el rango de concentraciones evaluadas para cada grupo de experimentación fue el siguiente: END 1: de 0,5 a 0,05 µg/L, END 2: de 1 a 0,1 µg/L, CIP1: de 0,5 a 0,05 µg/L, CIP 2: de 1 a 0,1 µg/L, y M: utilizando para este caso las menores concentraciones testeadas de cada compuesto. Al finalizar el período de exposición, se extrajo sangre de la vena espinal a todos los ejemplares y se aplicaron los biomarcadores de genotoxicidad.

En ambos experimentos se determinó la frecuencia de micronúcleos (FMN: número de eritrocitos con MN/1000 eritrocitos contados) y de anomalías nucleares (FAN: número de células con AN/1000 eritrocitos contados - AN: *buds*, notched: NN, binucleados: BiN, núcleos excéntricos: NE y anomalías nucleares totales: ANT) en eritrocitos de sangre periférica.

Los resultados indicaron que el CN no presenta diferencia con el CV en cuanto a la FMN y a la FAN, lo que demuestra que el etanol no causa daño genotóxico ($p > 0,05$) en ninguno de los experimentos.

Para el ensayo de exposición Embrionaria se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en la FMN en los grupos expuestos a END10 y CIP 100 ($p < 0,05$; Kruskal Wallis-Mann-Whitney), respecto al CN. En cuanto al experimental de exposición de neonatos, se encontraron diferencias significativas en las BiN en el grupo experimental de M ($p < 0,05$; Kruskal Wallis-Mann-Whitney), respecto al CN.

Podemos concluir que diferentes concentraciones de formulaciones comerciales de plaguicidas ejercen efectos a nivel genotóxico no dependiente de la concentración, mientras que no hubo efecto aditivo o sinérgico de la mezcla. Consideramos que son necesarios más estudios que nos permitan entender más acabadamente lo que estaría sucediendo durante las primeras etapas del desarrollo en esta especie, ambientalmente expuesta a estos plaguicidas en su hábitat natural.

Bibliografía

1. **Larriera, A., Imhof, A., Siroski, P.**, 2008. Estado actual de los programas de conservación y manejo de género *Caiman* en Argentina. En: Castroviejo, J., Ayarzagüena, J., Velasco, A. (Eds.), Contribución al conocimiento del Género Caiman de Suramerica, Public. Asoc. Amigos de Doña Ana 18, Sevilla, España, pp. 139-179.
2. **Carballo, M.A., Mudry, M.D.**, 2006. Indicadores y marcadores biológicos, in: Mudry, M.D., Carballo, M.A. (Eds.), Genética Toxicológica, De los Cuatro Vientos Editorial, Buenos Aires, Argentina, pp. 83-108.
3. **Carrasco, K.R.**, Tilbury, K.L., Myers, M.S., 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 2123-2136.
4. **Seriani, R.**, Tavares Ranzani-Paiva, M.J., Silva-Souza, A.T., Roseli Napoleão, S., 2011. Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas Gerais state, Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences. Maringá*, 33 (1) 107-112.